

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 768 051**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/52** (2006.01)

**C07K 16/24** (2006.01)

**C12N 15/115** (2010.01)

**A61K 31/7105** (2006.01)

**A61K 47/60** (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.08.2008 PCT/EP2008/006473**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.02.2009 WO09019007**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.08.2008 E 08801526 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.11.2019 EP 2190991**

54 Título: **Ácidos nucleicos de unión a SDF-1 y el uso de los mismos**

30 Prioridad:

**06.08.2007 EP 07015379**

**30.04.2008 EP 08008312**

**18.06.2008 EP 08011024**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**19.06.2020**

73 Titular/es:

**NOXXON PHARMA AG (100.0%)**

**Max-Dohrn-Strasse 8-10**

**10589 Berlin, DE**

72 Inventor/es:

**PURSCHKE, WERNER;**

**JAROSCH, FLORIAN;**

**EULBERG, DIRK;**

**KLUSSMANN, SVEN;**

**BUCHNER, KLAUS;**

**MAASCH, CHRISTIAN y**

**DINSE, NICOLE**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 768 051 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Ácidos nucleicos de unión a SDF-1 y el uso de los mismos

La presente solicitud se refiere a una molécula de ácido nucleico L- de unión a SDF-1 para usar en terapia, en donde la terapia comprende influenciar en la migración de células; una molécula de ácido nucleico L- de unión a SDF-1 para usar en un método para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad; una molécula de ácido nucleico L- de unión a SDF-1 para usar en un método para obtener células progenitoras y/o células madre a partir de un primer sujeto; una molécula de ácido nucleico L- para unirse a SDF-1 para usar en un método reducir células plasmáticas de vida larga, células B y/o células T de un sujeto; una molécula de ácido nucleico L- de unión a SDF-1 para usar en terapia; el uso de una molécula de ácido nucleico L- de unión a SDF-1 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad; el uso de una molécula de ácido nucleico L- de unión a SDF-1 para la fabricación de un medicamento para usar en un método para tratar y/o prevenir una enfermedad; el uso de una molécula de ácido nucleico L- de unión a SDF-1 para la fabricación de un medicamento, a través de la cual el medicamento es para el tratamiento de una enfermedad y/o trastorno que implica angiogénesis y/o neovascularización; el uso de una molécula de ácido nucleico L- de unión a SDF-1 para la fabricación de un medicamento, a través del cual el medicamento es para la restauración o mejora de un sistema inmune en un sujeto; y el uso de una molécula de unión a SDF-1 para la fabricación de un medicamento, a través del cual el medicamento es para la administración a un sujeto antes de o de forma simultánea con quimioterapia.

Quimioquinas. Las quimioquinas son una familia de proteínas pequeñas básicas de 8-14 kDa que se unen a heparina, estructuralmente relacionadas. Funcionalmente se pueden clasificar como proinflamatorias, homeostáticas, o de función dual (Moser, Wolf et al., 2004). Las quimioquinas inflamatorias se inducen mediante patógenos, citoquinas, o factores de crecimiento y captan leucocitos efectores a sitios de infección, inflamación, daño tisular o tumores. Tales quimioquinas regulan la reclutamiento, la activación, y la proliferación de células sanguíneas blancas, también referidas como leucocitos (Schall y Bacon 1994; Springer 1995; Baggiolini 1998). Las quimioquinas inducen selectivamente la quimiotaxis de neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monocitos, macrófagos, mastocitos, células T y B. Además de su efecto quimiotáctico, pueden ejercer selectivamente otros efectos en respuesta a células sensibles como cambios en la forma celular, incremento transitorio en la concentración de iones de calcio intracelulares libres, desgranulación, regulación al alza de integrinas, formación de lípidos bioactivos tales como, pero que no se limitan a, leucotrienos, prostaglandinas, tromboxanos, o explosión respiratoria, es decir, liberación de especies de oxígeno reactivo para la destrucción de organismos patógenos o células tumorales. Por tanto, mediante la provocación de la liberación de otros mediadores proinflamatorios, quimiotaxis y extravasación de leucocitos hacia sitios de infección o inflamación, las quimioquinas desencadenan el aumento de la respuesta inflamatoria. Las quimioquinas homeostáticas, por otro lado, se expresan en la médula ósea y en tejidos linfáticos de manera predominante, y están implicadas en la hematopoyesis, el control, y las respuestas inmunes adaptativas (Godessart 2005).

Clases de quimioquinas. En base a la disposición de los primeros dos de los cuatro restos de cisteína conservados, las quimioquinas se dividen en cuatro clases: CC o  $\beta$ -quimioquinas en los que las cisteínas están en tándem, CXC o  $\alpha$ -quimioquinas, donde están separados por un resto de aminoácido adicional, XC o  $\gamma$ -quimioquinas que poseen sólo un puente disulfuro, de esta manera la linfotactina que también es referida como XCL1 es la única representante hasta la fecha, quimioquinas CX3C que se caracterizan por tres restos aminoácidos entre las cisteínas siendo la fractalquina unida a membrana el único miembro de la clase (Bazan, Bacon et al., 1997). Las quimioquinas normalmente tienen dos nombres, uno que se relaciona con su función y otro que es el nombre sistemático, según las características de la secuencia.

Quimioquinas CXC. Las quimioquinas CXC actúan normalmente sobre los neutrófilos, en particular sobre las quimioquinas CXC que tienen la secuencia de aminoácidos ELR en su amino terminal. Ejemplos de quimioquinas CXC que son activas sobre neutrófilos son IL-8/CXCL8, GRO $\alpha$ /CXCL1, GRO $\beta$ /CXCL2, y GRO $\gamma$ /CXCL3, NAP-2/CXCL7, ENA-78/CXCL5, SDF-1/CXCL12 y GCP-2/CXCL6. Las quimioquinas CXC actúan sobre una gran variedad de leucocitos, tal como monocitos, macrófagos, eosinófilos, basófilos, así como linfocitos T y B (Oppenheim, Zachariae et al., 1991; Miller y Krangel 1992; Baggiolini, Dewald et al., 1994; Jose, Griffiths-Johnson et al., 1994; Ponath, Qin et al., 1996). Ejemplos de éstos son I-309/CCL1; MCP-1/CCL2, MCP-2/CCL8, MCP-3/CCL7, MCP-4/CCCL13, Mip-1 $\alpha$ /CCL3 y MIP1 $\beta$ /CCL4, RANTES/CCL5, y eotaxina/CCL11.

Receptores de quimioquinas CXC. Las quimioquinas actúan a través de receptores que pertenecen a una superfamilia de siete receptores unidos a proteína G que abarcan la membrana, también referidos como GPCRs (Murphy, Baggiolini et al., 2000)). En general, las interacciones de quimioquina y el receptor de quimioquina tienden a ser prolíficas en una quimioquina que se une a los receptores de quimioquina, y por otra parte un receptor de quimioquina en solitario puede interactuar con varias quimioquinas diferentes. Algunos receptores conocidos para las quimioquinas CXC incluyen CXCR1, que se une a GRO $\alpha$ , GCP-2, y IL-8; CXCR2, que se une a quimioquinas que incluyen GRO $\alpha$ , GRO $\beta$ , GRO $\gamma$ , ENA-78 y IL-8; CXCR3, que se une a quimioquinas que incluyen PF4, MIG, IP-10, y I-TAC; CXCR4 que hasta el momento ha encontrado sólo señal en respuesta a SDF-1, y CXCR5, que ha mostrado señal en respuesta a BCA-1 (Godessart 2005). Además se identificó CXCR4, un nuevo receptor de SDF-1 que es referido como RDC1/CXCR7 (Balabanian, Lagane et al., 2005, Burns, Summers et al., 2006).

- SDF-1. Factor 1 derivado de células estromales (abbr.: SDF-1; sinónimos, CXCL12; PBSF [factor estimulante del crecimiento de células pre-B]; TPAR-1 [gen 1 reprimido por TPA]; SCYB12; TLSF [factor estimulante de células de linfoma tímico]; hIRH [intercrina humana reducida en hepatomas]) es una quimioquina CXC angiogénica que no contiene el motivo ELR típico de las quimioquinas similares a IL-8 (Salcedo, Wasserman et al., 1999; Salcedo y Oppenheim 2003) que se une y activa el receptor acoplado a proteína G CXCR4. Esta quimioquina ha sido descubierta por tres grupos independientemente, bien mediante la clonación de ADNc que portan las secuencias señal N-terminales (Tashiro, Tada et al., 1993), por su capacidad para estimular progenitores tempranos de células B cuando se expresa en la línea celular estromática PA6 (Nagasawa, Kikutani et al., 1994), o bien mediante aislamiento a partir de un banco de ADNc construido a partir de fibroblastos de embrión de ratón tratados con el activador de proteína quinasa C acetato de tetradodecanoilforbol (abreviado: TPA) (Jiang, Zhou et al., 1994). Como resultado de un corte y empalme alternativo, existen dos formas de SDF-1, SDF-1 $\alpha$  (68 aa) y SDF-1 $\beta$ , que, comparado a SDF-1 $\alpha$  tiene cinco restos adicionales en el C-terminal (Shirozu, Nakano et al., 1995). Aún no se conoce completamente la importancia biológica de estas dos variantes de corte y empalme.
- Secuencias de SDF-1. La conservación de la secuencia entre SDF-1 de diferentes especies es notable: la SDF-1 $\alpha$  humana (SEQ ID NO:1) y la SDF-1 $\alpha$  murina (SEQ ID NO:2) son casi idénticas. Sólo aparece un único cambio conservativo de V a I en la posición 18 (Shirozu, Nakano et al., 1995).
- Estructura NMR de SDF-1. Existe un modelo estructural de NMR (registro PDB, 1SDF) para SDF-1 [8-68]. Se ha descubierto que la SDF-1 es un monómero con una región N-terminal desordenada. Las diferencias con otras quimioquinas se encuentran principalmente en el empaquetamiento del núcleo hidrófobo y en la distribución de la carga superficial (Crump, Gong et al., 1997).
- Actividades fisiológicas de SDF-1. Actividades fisiológicas de SDF-1: Puesto que el receptor CXCR4 de SDF-1 se expresa de modo generalizado sobre leucocitos, células dendríticas maduras, células endoteliales, células cerebrales y megacariocitos, las actividades de SDF-1 son pleiotrópicas. Esta quimioquina, más que cualquier otra identificada hasta la fecha, muestra la gama más amplia de funciones biológicas, en especial fuera del sistema inmunológico. Los efectos funcionales más significativos de SDF-1 son:
- Conducir y unir células epiteliales a sitios neovasculares en la porción del coroides de la retina. Se ha demostrado que la SDF-1 está implicada en la conducción de células epiteliales al coroides durante la neovascularización en el tejido ocular. El papel exacto de estas células aún sigue investigándose, pero la hipótesis publicada es que las células epiteliales están implicadas en la formación de vasos sanguíneos aberrantes (Sengupta, Caballero et al., 2005).
- Células madre. La SDF-1 es necesaria para mantener células madre y células progenitoras (normalmente CD34+) en la médula ósea del adulto. Puede emplearse AMD3100, un antagonista de CXCR4 selectivo, para movilizar las células CD34+ para el trasplante de células madre hematopoyéticas. Las células CD34+ migran in vitro e in vivo hacia un gradiente de SDF-1 producido por las células estromales (Aiuti, Webb et al., 1997).
- Desarrollo y quimiotaxis de células B. La SDF-1 apoya la proliferación de células pre-B y aumenta el crecimiento de progenitores de células B de la médula ósea (Nagasawa, Kikutani et al., 1994); induce la migración específica de células pre- y pro-B, aunque no actúa como quimioatrayente significativo para células B maduras (D'Apuzzo, Rolink et al., 1997; Bleul, Schultze et al., 1998). Probablemente, la SDF-1 es importante para colocar las células B dentro del tejido linfóide secundario.
- Quimiotaxis de células T. La SDF-1 es uno de los quimioatrayentes de células T más eficaz; CXCR4 está presente en muchos subconjuntos de células T (Bleul, Farzan et al., 1996).
- Desarrollo embrionario. La SDF-1 y su receptor CXCR4 son fundamentales para el desarrollo embrionario. Ratones con SDF-1 y CXCR4 inmunosuprimidos mueren de manera perinatal; muestran defectos en el septo ventricular cardíaco o un desarrollo cerebelar anómalo además de un número reducido de progenitores de células B y de células mieloides (Nagasawa, Hirota et al., 1996; Ma, Jones et al., 1998; Zou, Kottmann et al., 1998). La SDF-1 también es necesaria para la ontogenia normal del desarrollo de la sangre durante la embriogénesis (Juárez y Bendall, 2004).
- Infección por VIH. La SDF-1 es capaz de inhibir la entrada de VIH-1 T-trópica en líneas celulares que portan CXCR4, y la expresión de SDF-1 puede tener una relación importante en la patogénesis del SIDA, puesto que un polimorfismo en el gen SDF-1 humano afecta a la aparición del SIDA (Bleul, Farzan et al., 1996).
- Otros trastornos. Unos niveles de expresión alterados de SDF-1 o su receptor CXCR4 o unas respuestas alteradas hacia estas moléculas están asociados con muchas enfermedades humanas, tales como retinopatía (Brooks, Caballero et al., 2004; Butler, Guthrie et al., 2005; Meleth, Agron et al., 2005); cáncer de mama (Muller, Homey et al., 2001; Cabioglu, Sahin et al., 2005), ovarios (Scotton, Wilson et al., 2002), páncreas (Koshiba, Hosotani et al., 2000), tiroides (Hwang, Chung et al., 2003), y nasofaringe (Wang, Wu et al., 2005); glioma (Zhou, Larsen et al., 2002); neuroblastoma (Geminder, Sagi-Assif et al., 2001); leucemia linfocítica crónica de células B (Burger, Tsukada et al., 2000); síndrome WHIM (verrugas, hipogammaglobulinemia, infecciones, mielokatexis) (Gulino, Moratto et al., 2004; Balabanian, Lagane et al., 2005; Kawai, Choi et al., 2005); síndromes de deficiencia inmunológica (Arya, Ginsberg et

al., 1999; Marechal, Arenzana-Seisdedos et al., 1999; Soriano, Martínez et al., 2002); neovascularización patológica (Salvucci, Yao et al., 2002; Yamaguchi, Kusano et al., 2003; Grunewald, Avraham et al., 2006); inflamación (Murdoch 2000; Fedyk, Jones et al., 2001; Wang, Guan et al., 2001); esclerosis múltiple (Krumbholz, Theil et al., 2006); artritis reumatoide/osteoartritis (Buckley, Amft et al., 2000; Kanbe, Takagishi et al., 2002; Grassi, Cristino et al., 2004).

Antagonismo de SDF-1 y su receptor. En entornos experimentales en animales, los antagonistas de SDF-1 o su receptor han demostrado ser eficaces para bloquear el crecimiento y/o la propagación metastásica de células de cánceres humanos de diferente origen, tal como páncreas (Guleng, Tateishi et al., 2005; Saur, Seidler et al., 2005), colon (Zeelenberg, Ruuls-Van Stalle et al., 2003; Guleng, Tateishi et al., 2005), mama (Muller, Homey et al., 2001; Lapteva, Yang et al., 2005), pulmón (Phillips, Burdick et al., 2003), glioblastoma y meduloblastoma (Rubin, Kung et al., 2003), próstata (Sun, Schneider et al., 2005), osteosarcoma (Perissinotto, Cavalloni et al., 2005), melanoma (Takenaga, Tamamura et al., 2004), estómago (Yasumoto, Koizumi et al., 2006) y mieloma múltiple (Menu, Asosingh et al., 2006). Además, la terapia con anti-SDF-1 ha resultado beneficiosa en modelos animales para evitar la neovascularización retiniana (Butler, Guthrie et al., 2005, Mames, Mattheus et al., 2006), la nefritis (Balabanian, Couderc et al., 2003) y la artritis (Matthys, Hatse et al., 2001; Tamamura, Fujisawa et al., 2004; De Klerck, Geboes et al., 2005). Por otra parte, un antagonista de CXCR4 selectivo, AMD3100, se utilizó para movilizar células CD34+ para el trasplante de células madre hematopoyéticas. Las células CD34+ migran in vitro e in vivo a lo largo de un gradiente de SDF-1 producido por células estromales (Aiuti, Webb et al., 1997).

SDF-1 y enfermedades oculares. La SDF-1 desempeña un papel en la patología de enfermedades de la parte posterior del ojo, tales como la retinopatía diabética (siglas RD) (Fong, Aiello et al., 2004) y la degeneración macular relacionada con la edad (siglas DMRE) (Ambati, Anand et al., 2003). Estas dos enfermedades dañan al ojo y conducen a la pérdida gradual de visión que culmina en ceguera. Los daños aparecen debido al crecimiento inapropiado de vasos sanguíneos en la parte posterior del ojo, un proceso conocido como neovascularización coroidea (siglas CNV). Durante la CNV, nuevos vasos sanguíneos que se originan en el coroides migran a través de una rotura en la membrana de Bruch hacia el epitelio pigmentario subretiniano (siglas sub-RPE) o espacio subretiniano. Los vasos anómalos pueden sangrar, también referido como hemorragia intra-retiniana, o soltar fluidos bajo la retina. Esto puede dejar cicatrices y elevar la mácula, lo cual distorsiona la visión.

Retinopatía diabética. La retinopatía diabética (RD) es una secuela importante de la diabetes, y aparece con frecuencia en pacientes con ambos tipos de diabetes, de tipo 1 y tipo 2. Existen aproximadamente 16 millones de diabéticos en EE.UU. y casi 8 millones padecen alguna forma de RD. Cuando la retinopatía diabética proliferativa (siglas RDP) permanece sin tratar, aproximadamente 60% de los pacientes adquieren ceguera en uno o ambos ojos dentro de 5 años. Con el alarmante aumento en la frecuencia de la diabetes en Norteamérica, Europa y muchos países emergentes, la población de pacientes está creciendo con rapidez. Por ejemplo, la incidencia de la ceguera es 25 veces más alta en pacientes con diabetes que en la población general. Además, la RD es la causa más común de ceguera en sujetos de mediana edad, y es responsable de al menos 12% de todos los casos nuevos en Estados Unidos cada año. Se han puesto en marcha programas de exploración para que la visión de los pacientes diabéticos pueda controlarse y pueda administrarse un tratamiento, si está disponible, a tiempo.

Las causas directas de RD se conocen poco, pero se cree que la enfermedad tiene sus orígenes en una combinación de fuentes: una auto-regulación alterada del flujo sanguíneo retiniano; la acumulación de sorbitol dentro de las células retinianas; y la acumulación de productos finales de la glicosilación avanzada en el fluido extracelular. Todos estos factores están relacionados directa o indirectamente con la hiperglucemia, la abundancia de azúcar en el torrente sanguíneo.

Los síntomas de RD son similares a los de la DMRE. Los pacientes pierden células de la retina y aparecen microaneurismas, es decir, flujos de sangre, que aparecen en la membrana basal de la retina. Además, el factor de crecimiento endotelial vascular (siglas VEGF), el factor de crecimiento 1 similar a insulina (IGF-1) y otros factores transportados por la sangre, que pueden incluir la SDF-1, atraen a nuevas células vasculares y estimulan la formación de vasos sanguíneos que provocan daños.

Degeneración macular relacionada con la edad (DMRE). La DMRE destruye la visión central de una persona. Las etapas tempranas de la enfermedad incluso pueden pasar desapercibidas, porque los síntomas varían entre los pacientes. A veces, un paciente se ve afectado sólo en un ojo, o la visión puede deteriorarse en ambos ojos, aunque no significativamente. La enfermedad provoca distorsiones en la visión o una percepción defectuosa del color. A menudo aparece una mancha oscura en el centro del campo visual.

La etiología (desarrollo) de la enfermedad no se conoce bien. A menudo se piensa en la DMRE como el envejecimiento de la capa más externa de la retina. Aparecen alteraciones físicas en el centro de la retina, también denominada mácula, que es la parte de la retina relacionada con la visión más aguda.

La DMRE húmeda comienza como una secuela de la forma seca de la enfermedad. Aproximadamente 90% de los pacientes padecen la forma seca de la DMRE, que provoca el adelgazamiento de los tejidos maculares y alteraciones en su pigmentación. El resto presentan la forma húmeda, que implica neovascularización coroidea y a

menudo la formación de un edema macular y el sangrado de la retina y la sub-retina. Todo esto conduce a un rápido deterioro de la agudeza visual.

Hasta ahora la causa más común de ceguera en personas mayores de 55 es la DMRE que afecta aproximadamente del 4% al 5% de la población de Estados Unidos con una edad de 65-74 años, y casi al 10% de personas con 75 años o más. Existen alrededor de 5 millones de personas mayores de 80 años sólo en Estados Unidos que padecen esta enfermedad y se prevé que otros 5 millones de personas la padecerán para 2020.

Tumores. Los tumores (incluyendo a neoplasias y tumores sólidos y hematológicos) no son sólo masas de células cancerosas: la infiltración de los tumores por células inmunológicas es una característica del cáncer. Muchos cánceres humanos presentan una red compleja de quimioquinas que influye en el grado y fenotipo de este infiltrado, así como en el crecimiento, supervivencia y migración del tumor y en la angiogénesis. La mayoría de los tumores sólidos contienen muchas células estromales no malignas. De hecho, las células estromales a veces están en un número mayor que las células cancerígenas. Las células estromales predominantes que se encuentran en los cánceres son macrófagos, linfocitos, células endoteliales y fibroblastos.

SDF-1 en tumores. Las células de diferentes tipos de cáncer presentan diferentes perfiles de expresión del receptor de quimioquinas, pero el receptor CXCR4 de SDF-1 es el que se encuentra más habitualmente en células tumorales de ratón y humanas: las células tumorales procedentes de al menos 23 tipos diferentes de cánceres humanos de origen epitelial, mesenquimático y hematopoyético expresan CXCR4 (Balkwill, 2004) con SDF-1 como el único ligando conocido para CXCR4. Aparte del tejido de médula ósea y linfóide secundario, en donde se expresa constitutivamente, la SDF-1 se encuentra en sitios de tumores primarios en el linfoma (Corcione, Ottonello et al., 2000) y tumores cerebrales tanto de linaje neuronal como astrocítico. Además, está presente a niveles elevados en el cáncer de ovario (Scotton, Wilson et al., 2002) y pancreático (Koshiba, Hosotani et al., 2000), así como en sitios de metástasis en cáncer de mama (Muller, Homey et al., 2001) y de tiroides (Hwang, Chung et al., 2003), neuroblastoma y neoplasias hematológicas (Geminder, Sagi-Assif et al., 2001). Por el contrario, la expresión de CXCR4 es baja o está ausente en el epitelio normal de mama (Muller, Homey et al., 2001), ovario (Scotton, Wilson et al., 2002) y próstata (Sun, Schneider et al., 2005).

Además de CXCR4 se identificó un nuevo receptor SDF-1: RDC1/CXCR7 (Balabanian, Lagane et al. 2005, Burns, Summers et al., 2006). Estudios in vitro e in vivo con líneas celulares de cáncer de próstata sugieren que alteraciones en la expresión de CXCR7/RDC1 están asociadas con la mejora de actividades adhesivas e invasivas, además de una ventaja en la supervivencia. Además, se observó que los niveles de CXCR7/RDC1 están regulados por CXCR4 (Wang et al, 2008). En estudios in vitro e in vivo se ha demostrado que ambos receptores para SDF-1, principalmente CXCR4 y CXCR7 promueven el crecimiento tumoral, el potencial metastático y la resistencia a la apoptosis (quimioterapia inducida) en varios tumores, por ejemplo, cáncer de mama, glioblastomas, cáncer de ovario, neuroblastoma, cáncer de pulmón, de colon y de próstata (Burns et al., 2006; Li et al., 2008; Scotton et al., 2002; Yang et al., 2008; Zagzag et al., 2008).

Por tanto, la expresión de CXCR4 y CXCR7 parece ser una característica general de varios tumores.

Inhibición de la señalización del receptor de quimioquina como una opción terapéutica en el tratamiento del cáncer. La inhibición de la señalización del receptor de quimioquina en células tumorales tiene el potencial de inducir la detención del crecimiento o la apoptosis, y evitar la invasión y la metástasis in vivo como muestra la siguiente evidencia: la genosupresión de CXCR4 por ARNsi anula el crecimiento del tumor de mama (Lapteva, Yang et al., 2005); células de hibridoma-T que se transfectaron con una construcción que evita la expresión en la superficie de CXCR4 ya no pueden metastatizar a órganos distantes cuando se inyectan por vía intravenosa a ratones (Zeelenberg, Ruuls-Van Stalle et al., 2001); en experimentos similares con células de cáncer colorrectal, las metástasis de pulmón e hígado se redujeron mucho (Zeelenberg, Ruuls-Van Stalle et al., 2003); anticuerpos anti-CXCR4 inhiben la propagación de xenoinjertos de cáncer de mama hacia los nódulos linfáticos (Muller, Homey et al., 2001); el tratamiento de células linfoblastoides con anticuerpos anti-CXCR4 o anti-SDF-1 retrasa el crecimiento tumoral en ratones (NOD)/SCID (Bertolini, Dell'Agnola et al., 2002); anticuerpos anti-SDF-1 inhiben el desarrollo de metástasis de órganos de células de cáncer de pulmón no microcítico (siglas NSCLC) (Phillips, Burdick et al., 2003); la administración sistémica del antagonista de CXCR4 AMD3100 (AnorMED Inc.) inhibe el crecimiento de xenoinjertos de glioblastoma y meduloblastoma intracraneales, y aumenta la apoptosis de células tumorales dentro de las 24 horas (Rubin, Kung et al., 2003); anticuerpos anti-SDF-1 inhiben el crecimiento de células de cáncer de mama MCF-7 mezcladas con fibroblastos asociados a carcinoma (Orimo, Gupta et al., 2005); la neutralización de CXCR4 con anticuerpos bloquea la metástasis del cáncer de próstata y el crecimiento en sitios óseos (Sun, Schneider et al., 2005); el desarrollo de metástasis del pulmón después de la inyección de células de osteosarcoma se evita mediante la administración del antagonista de CXCR4 peptídico T134 (Perissinotto, Cavalloni et al., 2005).

Diferentes autores han llegado a la conclusión de que dirigirse al eje SDF-1/CXCR4 proporciona nuevas opciones terapéuticas para pacientes con cáncer:

Los tumores de ovario humanos expresan claramente SDF-1 y, a menor nivel, VEGF. Ambas proteínas son activadas por la hipoxia en el tumor. Unas concentraciones patológicas de cualquiera de estas proteínas por sí solas no son suficientes para inducir la angiogénesis in vivo, pero juntas, SDF-1 y VEGF en concentraciones patológicas

inducen la neovascularización de manera eficaz y sinérgica. Por tanto, la interrupción de este eje sinérgico, en lugar de VEGF en solitario, es una estrategia de antiangiogénesis nueva y eficaz para tratar el cáncer (Kryczek, Lange et al., 2005);

5 Las líneas de células de cáncer de mama, cuando están equipadas con la vía de señalización de SDF1/CXCR4 autocrina, muestran un comportamiento agresivo. Éste incluye un aumento de la invasividad y la migración, junto con un crecimiento más rápido. Por tanto, el eje SDF-1/CXCR4 puede proporcionar información importante para predecir la naturaleza agresiva y puede constituir dianas terapéuticas importantes en el cáncer de mama humano (Kang, Watkins et al., 2005);

10 La migración y la metástasis de células de cáncer de pulmón microcítico (siglas SCLC), que expresan niveles elevados de CXCR4, están reguladas por SDF-1. La activación de CXCR4 promueve la adhesión a células auxiliares (tales como células estromales) y moléculas de la matriz extracelular dentro del microentorno tumoral. Estas interacciones adhesivas dan como resultado una mayor resistencia de las células SCLC a la quimioterapia. Así, los inhibidores del eje SDF-1/CXCR4 aumentan la quimiosensibilidad de las células SCLC y conducen a nuevos caminos terapéuticos para pacientes con SCLC (Hartmann, Burger et al., 2004) y otros tumores.

15 Señalización del receptor de quimioquinas y tráfico de células madre. El eje SDF-1/CXCR4 emerge como un regulador crucial del tráfico de diversos tipos de células madre en el cuerpo. Puesto que la mayoría, sino todas, las neoplasias se originan en el compartimento de células madre/progenitoras, las células madre del cáncer también expresan CXCR4 sobre su superficie y, como resultado de esto, el eje SDF-1/CXCR4 está implicado en dirigir el tráfico/metástasis a órganos que expresan SDF-1 tales como, por ejemplo, nódulos linfáticos, pulmones, hígado, y  
20 huesos. En consecuencia, las estrategias dirigidas a modular el eje SDF-1/CXCR4 pueden tener importantes aplicaciones clínicas en la medicina regenerativa para transportar células madre normales a los tejidos, y en la oncología clínica para inhibir la metástasis de células madre cancerosas (Kucia, Reza et al., 2005).

Movilización de células madre. Los leucocitos, también conocidos como células sanguíneas blancas, incluyen los neutrófilos, macrófagos, eosinófilos, basófilos/mastocitos, células B y células T. Las células sanguíneas blancas se reemplazan continuamente a través del sistema hematopoyético, mediante la acción de factores estimulantes de colonias (CSFs) y varias citoquinas en células madre y células progenitoras en tejidos hematopoyéticos. De estos factores el factor conocido de forma más amplia es el factor estimulante de colonias (siglas G-CSF) que ha sido aprobado para usar para contrarrestar los efectos negativos de la quimioterapia mediante la estimulación de la  
25 producción de células sanguíneas blancas y células progenitoras (movilización de células madre sanguíneas periféricas). Existe un número de antígenos de superficie celular que se emplean como marcadores para la caracterización de poblaciones de células madre y progenitoras. Estos marcadores también se someten a cambio, siempre y cuando, se descubran más marcadores específicos. En la actualidad las células madre hematopoyéticas se caracterizan por ser CD34+, C-kit+, Sca-1+, CD45+, lin-, y CD38- (CD38 es también un marcador de linaje, por lo tanto, es innecesario para lin-). La médula ósea es también un hospedador de varios tipos de células madre que no son hematopoyéticas, pero pueden dar lugar a otros tipos de células y tejidos: células del sistema mesenquimático se caracterizan como CD34+, Sca-1+, lin-, BMPR+ y/o STRO-1+, células madre de tejidos comprometidos de la médula ósea: se definen actualmente como CXCR4+, CD34+, CD45-. Subpoblaciones de células madre de tejidos comprometidos de tejidos comprometidos de la médula ósea son (Majka et al., 2005):

células madre esqueléticas: Myf5+, MyoD+

40 células madre cardíacas: NKx2.5+, GATA4+

células madre hepáticas: CK19+,  $\alpha$ -fetoproteína+

células madre neuronales: nestina+, GATA4+

Se han presentado varios de otros factores para incrementar las células sanguíneas blancas y las células progenitoras, tanto en seres humanos como en sujetos animales. Estos agentes incluyen la colonia de macrófagos-granulocitos (siglas GM-CSF), interleuquina 1 (siglas IL-1), interleuquina 3 (siglas IL-3), interleuquina 8 (siglas IL-8), PIXY-321 (siglas GM-CSF/proteína de fusión IL-3), proteína inflamatoria de macrófagos (siglas MIP), GRO $\beta$  (CXCL2) y GRO $\beta$ T (CXCL2 $\Delta$ 4), factor de células madre, trombopoyetina y oncogen relacionado con el crecimiento, como agentes en solitario o en combinación (Broxmeyer, Benninger et al., 1995); Glaspy, Davis et al., 1996; Rosenfeld, Bolwell et al., 1996; Glaspy, Shpall et al., 1997; Vadhan-Raj, Murray et al., 1997; Broxmeyer, Orazi et al.,  
50 1998; Dale, Liles et al., 1998; Pruijt, Willemze et al., 1999; King, Horowitz et al., 2001).

Aunque los factores de crecimiento endógenos son eficaces farmacológicamente, las desventajas bien conocidas de emplear proteínas y péptidos como productos farmacéuticos destacan la necesidad de añadir al repertorio de dichos factores de crecimiento otros agentes que sean eficaces en la medida de lo posible, es decir, que incrementen las células progenitoras de leucocitos y de células madre respectivamente, preferiblemente para incrementar el nivel de  
55 los mismos en la sangre periférica de un sujeto. Por consiguiente, un problema subyacente de la presente solicitud es la de proporcionar medios y métodos para el tratamiento de enfermedades que estén causadas por o se asocien con un bajo nivel de células progenitoras de leucocitos y células madre, respectivamente.

- 5 Las células madre se movilizan bien permitir directamente la reparación de tejidos dañados en el mismo paciente en el que se inmovilizan, o bien se movilizan y se recogen a partir de un antígeno de leucocito humano (HLA) emparejado al donador y se administra al paciente bien de manera intravenosa o directamente en un tejido afectado. Lo último se puede realizar también con células madre que se inmovilizaron del propio paciente. Antes de la administración de las células madre, se pueden expandir y/o diferenciar *in vitro*.
- 10 Enfermedades alérgicas de las vías respiratorias y alergias de contacto. Se encontró que SDF-1 actúa como un agente quimiotáctico sobre células de mastocitos maduros y precursores – especialmente cuando se libera histamina a partir de células de mastocitos maduros, por ejemplo, mediante señalización de IgE a través de la unión al receptor Fc-epsilon en la superficie celular del mastocito (Godot, Arock et al., 2007). En un modelo de ratón con enfermedad alérgica de las vías respiratorias, la neutralización de CXCR4 mediada por anticuerpo, que se expresa en leucocitos como se destacó anteriormente, reduce la hiper capacidad de respuesta. Los anticuerpos reducen también la eosinofilia pulmonar, particularmente en el fluido de lavado broncoalveolar y del intersticio, a la mitad, indicando que las señales mediadas por CXCR4 contribuyen a la inflamación pulmonar. La neutralización de SDF-1- $\alpha$  da como resultado una reducción similar tanto en la inflamación alérgica pulmonar como en la hiper capacidad de respuesta de las vías áreas (Gonzalo, Lloyd et al., 2000). Existe evidencia de que SDF-1 contribuye a la angiogénesis. Esto se ha demostrado explícitamente por Hoshin et al., en asma mediante el análisis de biopsias bronquiales para angiogénesis y la expresión de SDF-1. La inmunohistoquímica de secciones de estas biopsias mostró que los sujetos asmáticos tenían un mayor grado de vascularidad y un mayor número de células SDF-1 positivas en comparación con los sujetos control (Hoshino, Aoike et al., 2003).
- 15
- 20 Por otra parte, las evidencias clínicas y experimentales indican que los leucocitos que infiltran la piel juegan un papel crucial en el inicio y el mantenimiento de la dermatitis atópica y se ha demostrado que SDF-1 es un factor importante para el reclutamiento de linfocitos T y de células dendríticas, especialmente de células dendríticas de Langerhans (Gombert, Dieu-Nosjean et al., 2005).
- 25 Psoriasis. La psoriasis es una enfermedad inflamatoria cutánea con una base del componente auto-inmunológico. La psoriasis se caracteriza por una fuerte infiltración de leucocitos en la piel afectada, con células T que juegan un papel importante. Zhou et al. encontraron entre otros un incremento de la expresión de ARNm de SDF-1 en lesiones de piel psoriásica (Zhou, Krueger et al., 2003).
- 30 Inflamación articular. Existe evidencia en la bibliografía de la implicación del eje SDF-1/CXCR4 en la inflamación articular. Matthys et al., mostraron que AMD3100, un antagonista de CXCR4 potente y específico, inhibe la inflamación articular autoinmune en ratones con el receptor deficiente (Matthys, Hatse et al., 2001). La expresión de SDF-1 se observó también en biopsias sinoviales y por RT-PCR a partir de sujetos afectados por espondiloartropatía, artritis reumatoide, artritis psoriásica y enfermedad articular degenerativa (osteoartritis). Sin embargo, la sobre-expresión no se vio en todos los casos (Gu, Marker-Hermann et al., 2002). Se encontraron resultados similares para CXCR4 empleando RT-PCR.
- 35 Artritis reumatoide. Más recientemente, se encontraron niveles de SDF-1 aumentados en fluido sinovial de pacientes con artritis reumatoide en comparación con pacientes con osteoartritis (Kim, Cho et al., 2007). Los autores describieron también que en un cultivo celular, la expresión de SDF-1 a partir de sinoviocitos similares a fibroblastos se regulaba al alza mediante el co-cultivo de estas células con células T. Este efecto se observó también mediante la adición al medio de cultivo de IL-17, una citoquina de célula T.
- 40 La inmunohistoquímica sobre secciones de biopsias articulares revelaron que SDF-1 se expresa en el sinovio de articulaciones afectadas por artritis psoriásica. Se observó una rápida y significativa mejora clínica después del tratamiento con infliximab en los 9 pacientes. Esta se acompañó de una reducción de los niveles de SDF-1 sinoviales entre otros factores (las biopsias se tomaron después de 8 semanas de terapia) (Gu, Marker-Hermann et al., 2002).
- 45 Aunque estas manifestaciones de infiltración leucocitaria es característica de las enfermedades alérgicas se podrían desarrollar reacciones alérgicas e inflamatorias en enfermedades autoinmunes con tratamiento no eficaz de tales enfermedades. Son necesarios otros agentes que afecten en la medida de lo posible el curso de tales enfermedades, y preferiblemente que afecte a la infiltración leucocitaria. Por consiguiente, otro problema subyacente de la presente solicitud es la de proporcionar medios y métodos para inhibir o reducir la infiltración de leucocitos en los tejidos. Otro problema subyacente de la presente solicitud es proporcionar medios y métodos para el tratamiento de enfermedades que están causadas o se asocian con una infiltración de leucocitos en los tejidos o con un incremento del nivel de infiltración de tales leucocitos en los tejidos.
- 50
- 55 La señalización de SDF-1 y su receptor afecta a la migración de células dentro del cuerpo, preferiblemente de un tejido a otro tejido, de un tejido a la sangre periférica y/o de la sangre periférica a un tejido, conduciendo a varias enfermedades y trastornos. Una interferencia específica, preferiblemente la inhibición de la interacción entre SDF-1 y el receptor o receptores de SDF-1, pueden causar la mejora de varias enfermedades y trastornos. En vista de lo anterior, el problema subyacente principal de la presente solicitud es proporcionar medios y métodos para afectar a la migración de células dentro del cuerpo, preferiblemente de un tejido a otro tejido, de un tejido a la sangre periférica y/o de la sangre periférica a un tejido, de este modo tal migración conduce o se asocia con varias

enfermedades y trastornos. Otro problema subyacente de la presente solicitud es proporcionar medios y métodos que sean causados o se asocien con la migración de las células dentro del cuerpo, preferiblemente de un tejido a otro tejido, de un tejido a la sangre periférica y/o de la sangre periférica un tejido, conduciendo a varias enfermedades y trastornos.

5 La Patente WO 2006/032143 se refiere a composiciones farmacéuticas y métodos que se refieren a la inhibición de adhesiones fibrosas de enfermedades inflamatorias empleando fucanos poco sulfatados.

La Patente US 2003/017485 se refiere a un ensayo de migración celular que permite la identificación y la discriminación de antagonistas del receptor de quimioquina a partir de bloqueadores no específicos.

10 El problema subyacente de la presente solicitud es resolver mediante el objeto de estudio las reivindicaciones independientes adjuntas; se pueden extraer realizaciones preferidas a partir de las reivindicaciones dependientes adjuntas.

15 Más específicamente, el problema subyacente de la presente invención se resuelve en un primer aspecto mediante una molécula de ácido nucleico L- de unión a SDF-1 para uso en terapia, en donde la terapia comprende influir en la migración de las células, de este modo la migración de las células comprende la movilización de células en la sangre periférica de un sujeto, en las que las células se seleccionan del grupo que consiste en células madre, células cancerosas, células plasmáticas de vida larga, células B y células T, de este modo la molécula de ácido nucleico se selecciona del grupo que consiste en moléculas de ácido nucleico A, moléculas de ácido nucleico de tipo B, moléculas de ácido nucleico de tipo C y moléculas de ácido nucleico que tienen una secuencia de ácido nucleico según cualquiera de SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 143, SEQ ID NO: 144, mediante la cual las moléculas de ácido nucleico A comprenden la siguiente secuencia de nucleótidos central:

20 5' AAAGYRACAHGUMAAX<sub>A</sub>UGAAAGGUARC 3' (SEQ ID NO: 19)

en la que X<sub>A</sub> está ausente o es A,

en la que las moléculas de ácidos nucleicos de tipo B comprende la siguiente secuencia de nucleótidos central:

25 5' GUGUGAUCUAGAUGUADWGGCUGWUCCUAGUYAGG 3' (SEQ ID NO: 57), y en la que las moléculas de ácido nucleicos de tipo C comprende una secuencia de nucleótidos central de GGUYAGGGCUHRX<sub>A</sub>AGUCGG (SEQ ID NO: 90),

en la que X<sub>A</sub> está ausente o es A.

30 Más específicamente, el problema subyacente de la presente invención se resuelve en un segundo aspecto mediante una molécula de ácido nucleico L- de unión a SDF-1 para usar en un método para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad, en la que la enfermedad se selecciona del grupo que consiste en lupus sistémico eritematoso y manifestaciones del mismo, glomerulonefritis y nefropatía, preferiblemente nefropatía diabética; en la que la molécula de ácido nucleico se selecciona del grupo que consiste en moléculas de ácido nucleico de tipo A, moléculas de ácido nucleico de tipo B, moléculas de ácido nucleico de tipo C y moléculas de ácido nucleico que tienen una secuencia de ácidos nucleicos según cualquiera de SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 143, SEQ ID NO: 144, mediante la cual las moléculas de ácido nucleico A comprenden la siguiente secuencia de nucleótidos central:

35 5' AAAGYRACAHGUMAAX<sub>A</sub>UGAAAGGUARC 3' (SEQ ID NO: 19)

en la que X<sub>A</sub> está ausente o es A,

en la que las moléculas de ácidos nucleicos de tipo B comprende la siguiente secuencia de nucleótidos central:

40 5' GUGUGAUCUAGAUGUADWGGCUGWUCCUAGUYAGG 3' (SEQ ID NO: 57), y en la que las moléculas de ácido nucleicos de tipo C comprende una secuencia de nucleótidos central de GGUYAGGGCUHRX<sub>A</sub>AGUCGG (SEQ ID NO: 90),

en la que X<sub>A</sub> está ausente o es A.

En una realización del segundo aspecto, la molécula de ácido nucleico L- inhibe la migración de leucocitos, células dendríticas y mastocitos.

45 Más específicamente, el problema subyacente de la presente invención se resuelve en un tercer aspecto mediante una molécula de ácido nucleico L- de unión a SDF-1 para usar en un método para obtener células progenitoras y/o células madre a partir de un primer sujeto, en el que el método comprende

a) administrar al sujeto la molécula de ácido nucleico en una cantidad eficaz para movilizar dichas células progenitoras y/o células madre en la sangre periférica de dicho sujeto;

50 b) seguido del cultivo de dichas células progenitoras y/o células madre a partir de dicho sujeto,

en el que la molécula de ácido nucleico se selecciona del grupo que consiste en moléculas de ácido nucleico de tipo A, moléculas de ácido nucleico de tipo B, moléculas de ácido nucleico de tipo C y moléculas de ácido nucleico según cualquiera de SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 143 y SEQ ID NO: 144,

en la que las moléculas de ácido nucleico de tipo A comprenden la siguiente secuencia de nucleótidos central:

5 5' AAAGYRACAHGUMAAX<sub>A</sub>UGAAAGGUARC 3' (SEQ ID NO: 19)

en la que X<sub>A</sub> está ausente o es A,

en la que las moléculas de ácidos nucleicos de tipo B comprende la siguiente secuencia de nucleótidos central:

10 5' GUGUGAUCUAGAUGUADWGGCUGWUCCUAGUYAGG 3' (SEQ ID NO: 57), y en la que las moléculas de ácido nucleicos de tipo C comprende una secuencia de nucleótidos central de GGUYAGGGCUHRX<sub>A</sub>AGUCGG (SEQ ID NO: 90),

en la que X<sub>A</sub> está ausente o es A.

Más específicamente, el problema subyacente de la presente invención se resuelve en un cuarto aspecto mediante una molécula de ácido nucleico L- de unión a SDF-1 para reducir células plasmáticas de vida prolongada, células B y/o células T a partir de un sujeto, en el que el método comprende

15 a) administrar al sujeto la molécula de ácido nucleico en una cantidad eficaz para movilizar dichas células plasmáticas de vida prolongada, células B y/o células T de en la sangre periférica de dicho sujeto;

b) seguido del cultivo de dichas células plasmáticas de vida prolongada, células B y/o células T a partir de dicho sujeto;

20 en el que la molécula de ácido nucleico se selecciona del grupo que consiste en moléculas de ácido nucleico de tipo A, moléculas de ácido nucleico de tipo B, moléculas de ácido nucleico de tipo C y moléculas de ácido nucleico según cualquiera de SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 143 y SEQ ID NO: 144,

en la que las moléculas de ácido nucleico de tipo A comprenden la siguiente secuencia de nucleótidos central:

5' AAAGYRACAHGUMAAX<sub>A</sub>UGAAAGGUARC 3' (SEQ ID NO: 19)

en la que X<sub>A</sub> está ausente o es A,

25 en la que las moléculas de ácidos nucleicos de tipo B comprende la siguiente secuencia de nucleótidos central:

5' GUGUGAUCUAGAUGUADWGGCUGWUCCUAGUYAGG 3' (SEQ ID NO: 57), y en la que las moléculas de ácido nucleicos de tipo C comprende una secuencia de nucleótidos central de GGUYAGGGCUHRX<sub>A</sub>AGUCGG (SEQ ID NO: 90),

en la que X<sub>A</sub> está ausente o es A.

30 Más específicamente, el problema subyacente de la presente invención se resuelve en un quinto aspecto mediante una molécula de ácido nucleico L- de unión a SDF-1 para usar en terapia, en donde la terapia comprende inhibir la migración de leucocitos, en donde la molécula de ácido nucleico se selecciona del grupo que consiste en moléculas de ácido nucleico de tipo A, moléculas de ácido nucleico de tipo B, moléculas de ácido nucleico de tipo C y moléculas de ácido que tienen una secuencia de ácido nucleico según una cualquiera de SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 143, SEQ ID NO: 144, mediante la cual las moléculas de ácido nucleico A comprenden la siguiente secuencia de nucleótidos central:

35 5' AAAGYRACAHGUMAAX<sub>A</sub>UGAAAGGUARC 3' (SEQ ID NO: 19)

en la que X<sub>A</sub> está ausente o es A,

en la que las moléculas de ácidos nucleicos de tipo B comprende la siguiente secuencia de nucleótidos central:

40 5' GUGUGAUCUAGAUGUADWGGCUGWUCCUAGUYAGG 3' (SEQ ID NO 57), y en la que las moléculas de ácido nucleicos de tipo C comprende una secuencia de nucleótidos central de GGUYAGGGCUHRX<sub>A</sub>AGUCGG (SEQ ID NO: 90),

en la que X<sub>A</sub> está ausente o es A.

45 En una realización del aspecto quinto, sobre migración de los leucocitos, los leucocitos se acumulan en un tejido, en el que preferiblemente la acumulación de los leucocitos conduce a una inflamación en el tejido.

Más específicamente, el problema subyacente de la presente invención se resuelve en un sexto aspecto mediante el empleo de una molécula de ácido nucleico L- de unión a SDF-1 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en lupus sistémico eritematoso y manifestaciones del mismo, glomerulonefritis y nefropatía, preferiblemente nefropatía diabética;

- 5 en la que la molécula de ácido nucleico se selecciona del grupo que consiste en moléculas de ácido nucleico de tipo A, moléculas de ácido nucleico de tipo B, moléculas de ácido nucleico de tipo C y moléculas que tienen una secuencia de ácidos nucleicos según cualquiera de SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 143, SEQ ID NO: 144, mediante la cual las moléculas de ácido nucleico A comprenden la siguiente secuencia de nucleótidos central:

5' AAAGYRACAHGUMAAX<sub>A</sub>UGAAAGGUARC 3' (SEQ ID NO: 19)

- 10 en la que X<sub>A</sub> está ausente o es A,

en la que las moléculas de ácidos nucleicos de tipo B comprende la siguiente secuencia de nucleótidos central:

5' GUGUGAUCUAGAUGUADWGGCUGWUCCUAGUYAGG 3' (SEQ ID NO 57), y en la que las moléculas de ácido nucleicos de tipo C comprende una secuencia de nucleótidos central de GGUYAGGGCUHRX<sub>A</sub>AGUCGG (SEQ ID NO: 90),

- 15 en la que X<sub>A</sub> está ausente o es A.

En una realización del aspecto sexto, la molécula de ácido nucleico L- inhibe la migración de leucocitos, células dendríticas y mastocitos.

- 20 Más específicamente, el problema subyacente de la presente invención se resuelve en un séptimo aspecto mediante el empleo de una molécula de ácido nucleico L- de unión a SDF-1 para la fabricación de un medicamento para uso en un método para tratar y/o prevenir una enfermedad, en donde el método comprende inhibir la migración de leucocitos, en el que la molécula de ácido nucleico se selecciona del grupo que consiste en moléculas de ácido nucleico A, moléculas de ácido nucleico B, moléculas de ácido nucleico C y moléculas de ácido nucleico que tienen una secuencia de ácido nucleico según una cualquiera de SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 143, SEQ ID NO: 144, mediante la cual las moléculas de ácido nucleico de tipo A comprenden la siguiente secuencia de nucleótidos central:

- 25 5' AAAGYRACAHGUMAAX<sub>A</sub>UGAAAGGUARC 3' (SEQ ID NO: 19)

en la que X<sub>A</sub> está ausente o es A,

en la que las moléculas de ácidos nucleicos de tipo B comprende la siguiente secuencia de nucleótidos central:

5' GUGUGAUCUAGAUGUADWGGCUGWUCCUAGUYAGG 3' (SEQ ID NO: 57), y

- 30 en la que las moléculas de ácido nucleicos de tipo C comprende una secuencia de nucleótidos central de GGUYAGGGCUHRX<sub>A</sub>AGUCGG (SEQ ID NO: 90),

en la que X<sub>A</sub> está ausente o es A.

- 35 Más específicamente, el problema subyacente de la presente invención se resuelve en un octavo aspecto mediante el empleo de una molécula de ácido nucleico L- de unión a SDF-1 para la fabricación de un medicamento, en el que el medicamento es para el tratamiento de una enfermedad y/o trastorno que implica angiogénesis y/o neovascularización, en el que el medicamento es para uso en terapia de combinación con un agente que inhibe VEGF, y en el que la molécula de ácido nucleico se selecciona del grupo que consiste en moléculas de ácido nucleico de tipo A, en moléculas de ácido nucleico de tipo B, en moléculas de ácido nucleico de tipo C y moléculas de ácido nucleico que tienen una secuencia de ácidos nucleicos según una cualquiera de SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 143, SEQ ID NO: 144, mediante la cual las moléculas de ácido nucleico de tipo A comprenden la siguiente secuencia de nucleótidos central:

- 40 5' AAAGYRACAHGUMAAX<sub>A</sub>UGAAAGGUARC 3' (SEQ ID NO: 19)

en la que X<sub>A</sub> está ausente o es A,

en la que las moléculas de ácidos nucleicos de tipo B comprende la siguiente secuencia de nucleótidos central:

- 45 5' GUGUGAUCUAGAUGUADWGGCUGWUCCUAGUYAGG 3' (SEQ ID NO: 57), y

en la que las moléculas de ácido nucleicos de tipo C comprende una secuencia de nucleótidos central de GGUYAGGGCUHRX<sub>A</sub>AGUCGG (SEQ ID NO: 90),

en la que X<sub>A</sub> está ausente o es A.

Más específicamente, el problema subyacente de la presente invención se resuelve en un noveno aspecto mediante el empleo de una molécula de ácido nucleico L- de unión a SDF-1 para la fabricación de un medicamento, en el que el medicamento es para la restauración o mejora de un sistema inmunológico en un sujeto y en el que la molécula de ácido nucleico se selecciona del grupo que consiste en moléculas de ácido nucleico de tipo A, en moléculas de ácido nucleico de tipo B, en moléculas de ácido nucleico de tipo C y moléculas de ácido nucleico que tienen una secuencia de ácidos nucleicos según una cualquiera de SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 143, SEQ ID NO: 144, mediante la cual las moléculas de ácido nucleico de tipo A comprenden la siguiente secuencia de nucleótidos central:

5' AAAGYRACAHGUMAAX<sub>A</sub>UGAAAGGUARC 3' (SEQ ID NO: 19)

10 en la que X<sub>A</sub> está ausente o es A,

en la que las moléculas de ácidos nucleicos de tipo B comprende la siguiente secuencia de nucleótidos central:

5' GUGUGAUCUAGAUGUADWGGCUGWUCCUAGUYAGG 3' (SEQ ID NO: 57), y en la que las moléculas de ácido nucleicos de tipo C comprende una secuencia de nucleótidos central de GGUYAGGGCUHRX<sub>A</sub>AGUCGG (SEQ ID NO: 90),

15 en la que X<sub>A</sub> está ausente o es A.

Más específicamente, el problema subyacente de la presente invención se resuelve en un décimo aspecto mediante el empleo de una molécula de ácido nucleico L- de unión a SDF-1 para la fabricación de un medicamento, en el que el medicamento es para la administración a un sujeto antes o de manera simultánea con u quimioterapia, preferiblemente quimioterapia administrada para el tratamiento del cáncer, y en el que la molécula de ácido nucleico se selecciona del grupo que consiste en moléculas de ácido nucleico de tipo A, en moléculas de ácido nucleico de tipo B, en moléculas de ácido nucleico de tipo C y moléculas de ácido nucleico que tienen una secuencia de ácidos nucleicos según una cualquiera de SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 143, SEQ ID NO: 144, mediante la cual las moléculas de ácido nucleico de tipo A comprenden la siguiente secuencia de nucleótidos central:

5' AAAGYRACAHGUMAAX<sub>A</sub>UGAAAGGUARC 3' (SEQ ID NO: 19)

25 en la que X<sub>A</sub> está ausente o es A,

en la que las moléculas de ácidos nucleicos de tipo B comprende la siguiente secuencia de nucleótidos central:

5' GUGUGAUCUAGAUGUADWGGCUGWUCCUAGUYAGG 3' (SEQ ID NO 57), y en la que las moléculas de ácido nucleicos de tipo C comprende una secuencia de nucleótidos central de GGUYAGGGCUHRX<sub>A</sub>AGUCGG (SEQ ID NO: 90),

30 en la que X<sub>A</sub> está ausente o es A.

En una realización del primer, segundo, tercero, cuarto, quinto, sexto, séptimo, octavo, noveno y décimo aspecto, la molécula de ácido nucleico comprende una modificación, en el que la modificación se selecciona del grupo que comprende una fracción HES y una fracción PEG.

35 En una realización del primer, segundo, tercero, cuarto, quinto, sexto, séptimo, octavo, noveno y décimo aspecto, la molécula de ácido nucleico es una molécula de ácido nucleico de tipo A, en la que la molécula de ácido nucleico de tipo A tiene una molécula de ácido nucleico según una cualquiera de SEQ ID NOs 5 a 18, 25 a 41, 133, 137 y 139 a 141.

40 En una realización del primer, segundo, tercero, cuarto, quinto, sexto, séptimo, octavo, noveno y décimo aspecto, la molécula de ácido nucleico es una molécula de ácido nucleico de tipo B, en la que la molécula de ácido nucleico de tipo B tiene una molécula de ácido nucleico según una cualquiera de SEQ ID NOs 46 a 56, 61 a 72, y 132.

En una realización del primer, segundo, tercero, cuarto, quinto, sexto, séptimo, octavo, noveno y décimo aspecto, la molécula de ácido nucleico es una molécula de ácido nucleico de tipo C, en la que la molécula de ácido nucleico de tipo C tiene una molécula de ácido nucleico según una cualquiera de SEQ ID NOs 79 a 89, 94 a 119, y 134 a 136.

En una realización del primer aspecto, las células B y/o células T son células B memoria y/o células T memoria.

45 En una realización del primer aspecto, las células progenitoras y/o células madre comprenden células progenitoras CD34+.

En una realización del primer aspecto, la movilización de las células progenitoras y/o las células madre tiene lugar en un tejido hematopoyético.

50 En una realización el tejido hematopoyético es al menos un tejido mieloide y un tejido linfoide, en el que preferiblemente el tejido mieloide se localiza en la médula ósea, y preferiblemente el tejido linfoide se localiza en la

mucosa del tracto digestivo, el tracto respiratorio, los nódulos linfáticos, el bazo, el timo y/o folículos linfoides en un tejido inflamado.

En una realización del primer aspecto, la molécula de ácido nucleico inhibe la migración de los leucocitos.

5 En una realización del primer aspecto, que es también una realización de la sexta realización del primer aspecto los leucocitos son linfocitos-T, linfocitos-B, monocitos, macrófagos, eosinófilos, neutrófilos, basófilos, células dendríticas y/o mastocitos.

En una realización del primer aspecto, que es también una realización de la sexta y la séptima realización del primer aspecto, sobre migración de leucocitos, los leucocitos se acumulan en un tejido, en el que preferiblemente la acumulación de los leucocitos conduce a una inflamación de dicho tejido.

10 En una realización del primer aspecto, que es también una realización de la octava realización del primer aspecto el tejido comprende piel, mucosa, órganos como los seleccionados pero no restringidos a ojo, cerebro, pulmón, riñones, corazón, hígado, tracto gastrointestinal, bazo, piel, huesos y/o sistema linfático, preferiblemente piel y/o mucosa de las vías respiratorias.

15 En una realización del primer aspecto, que es también una realización del primer aspecto y de cualquiera de la primera a la novena realización del primer aspecto la molécula de ácido nucleico se selecciona del grupo que comprende moléculas de ácido nucleico de tipo A, moléculas de ácido nucleico de tipo B, moléculas de ácido nucleico de tipo C y moléculas de ácido nucleico que tienen una secuencia de ácido nucleico según una cualquiera de SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 143, SEQ ID NO: 144.

20 En una realización de cualquiera del primer al décimo aspecto, las moléculas de ácido nucleico de tipo A comprenden la siguiente secuencia de nucleótidos central:

5' AAAGYRACAHGUMAAX<sub>A</sub>UGAAAGGUARC 3' (SEQ ID NO: 19)

en la que X<sub>A</sub> está ausente o es A.

En una realización de cualquiera del primer al décimo aspecto, las moléculas de ácido nucleico de tipo A comprenden una secuencia de nucleótidos central seleccionada del grupo que comprende

25 5' AAAGYRACAHGUMAAUGAAAGGUARC 3' (SEQ ID NO: 20),

5' AAAGYRACAHGUMAAAUGAAAGGUARC 3' (SEQ ID NO: 21), y

5' AAAGYAACAHGUCAAUGAAAGGUARC 3' (SEQ ID NO: 22), preferiblemente la secuencia de nucleótidos central comprende

5' AAAGYAACAHGUCAAUGAAAGGUARC 3' (SEQ ID NO: 22).

30 En una realización de cualquiera del primer al décimo aspecto, la molécula de ácido nucleico comprende la dirección en 5'→3' un primer tramo de nucleótidos, la secuencia de nucleótidos central, y un segundo tramo de nucleótidos.

En una realización de cualquiera del primer al décimo aspecto, la molécula de ácido nucleico comprende un segundo tramo de nucleótidos en dirección 5'→3', la secuencia de nucleótidos central, y un primer tramo de nucleótidos.

35 En una realización de cualquiera del primer al décimo aspecto, la molécula de ácido nucleico comprende el primer y el segundo tramo de nucleótidos y dicho primer y segundo tramo de nucleótidos hibridan opcionalmente el uno con el otro, en el que se forma una estructura de doble cadena en la hibridación.

En una realización cualquiera del primer al décimo aspecto, la estructura de doble cadena consiste en cuatro a seis pares de bases, preferiblemente cinco pares de bases.

40 En una realización de cualquiera del primer al décimo aspecto, el primer tramo de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>NNBV 3' (SEQ ID NO: 44) y el segundo tramo de nucleótidos comprende una secuencia de 5' BNBX<sub>3</sub>X<sub>4</sub> 3' (SEQ ID NO: 45) en el que X<sub>1</sub> está o bien ausente o R, X<sub>2</sub> son S, X<sub>3</sub> es S y X<sub>4</sub> está ausente o es Y; o X<sub>1</sub> está ausente, X<sub>2</sub> está ausente o es S y X<sub>3</sub> o está ausente o es S y X<sub>4</sub> está ausente.

45 En una realización de cualquiera del primer al décimo aspecto, el primer tramo de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' RSHRYR 3' (SEQ ID NO: 23) y el segundo tramo de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' YRYDSY 3' (SEQ ID NO: 24), preferiblemente el primer tramo de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' GCUGUG 3' y el segundo tramo de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' CGCAGC 3'.

50 En una realización de cualquiera del primer al décimo aspecto, el primer tramo de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' X<sub>2</sub>BBBS 3' (SEQ ID NO: 42) y el segundo tramo de nucleótidos comprende una

- 5 secuencia de nucleótidos de 5' SBBVX<sub>3</sub> 3' (SEQ ID NO: 43), en el que X<sub>2</sub> o está ausente o es S y X<sub>3</sub> o está ausente o es S; preferiblemente el primer tramo de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' CUGUG 3' y el segundo tramo de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' CGCAG 3'; o el primer tramo de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' GCGUG 3' y el segundo tramo de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' CGCGC 3'.
- En una realización de cualquiera del primer al décimo aspecto, la molécula de ácido nucleico tienen una secuencia de ácido nucleico según cualquiera de SEQ ID NOs 5 a 18, 25 a 41, 133, 137, 139 a 141.
- En una realización de cualquiera del primer al décimo aspecto, las moléculas de ácido nucleico de tipo B comprenden la siguiente secuencia de nucleótidos central:
- 10 5' GUGUGAUCUAGAUGUADWGGCUGWUCCUAGUYAGG 3' (SEQ ID NO: 57).
- En una realización de cualquiera del primer al décimo aspecto, las moléculas de ácido nucleico de tipo B comprenden una secuencia de nucleótidos central de GUGUGAUCUAGAUGUADUGGCUGAUCCUAGUCAGG (SEQ ID NO: 58).
- 15 En una realización de cualquiera del primer al décimo aspecto, la molécula de ácido nucleico comprende en dirección 5'→3' un primer tramo de nucleótidos, la secuencia de nucleótidos central, y un segundo tramo de nucleótidos.
- En una realización de cualquiera del primer al décimo aspecto, la molécula de ácido nucleico comprende el primer y el segundo tramo de nucleótidos y dicho primer y segundo tramo de nucleótidos hibrida opcionalmente el uno con el otro, en el que se forma una estructura de doble cadena en la hibridación.
- 20 En una realización de cualquiera del primer al décimo aspecto, la estructura de doble cadena consiste en cuatro a seis pares de base, preferiblemente cinco pares de bases.
- En una realización de cualquiera del primer al décimo aspecto, el primer tramo de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>SVNS 3' (SEQ ID NO: 77) y el segundo tramo de nucleótidos comprende una secuencia central de 5' BVBSX<sub>3</sub>X<sub>4</sub> 3' (SEQ ID NO: 78), en el que X<sub>1</sub> está ausente o es A, X<sub>2</sub> es G, X<sub>3</sub> es C y X<sub>4</sub> está ausente o es U; o X<sub>1</sub> está ausente, X<sub>2</sub> está ausente o es G, X<sub>3</sub> es C y X<sub>4</sub> está ausente.
- 25 En una realización de cualquiera del primer al décimo aspecto, el primer tramo de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' X<sub>1</sub>GCRWG 3' (SEQ ID NO: 59) y el segundo tramo de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' KRYSCX<sub>4</sub> (SEQ ID NO: 60), en el que X<sub>1</sub> está ausente o es A, y X<sub>4</sub> está ausente o es U.
- 30 En una realización de cualquiera del primer al décimo aspecto, el primer tramo de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' X<sub>1</sub>GCGUG 3' (SEQ ID NO: 75) y el segundo tramo de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' UACGCX<sub>4</sub> 3' (SEQ ID NO: 76), en el que X<sub>1</sub> está ausente o es A, y X<sub>4</sub> está ausente o es U, preferiblemente el primer tramo de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' AGCGUG 3' y el segundo tramo de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' UACGCU 3'.
- 35 En una realización de cualquiera del primer al décimo aspecto, el primer tramo de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' X<sub>2</sub>SSBS 3' (SEQ ID NO: 73) y el segundo tramo de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' BVSSX<sub>3</sub> 3' (SEQ ID NO: 74), en la que X<sub>2</sub> o está ausente o es G, y X<sub>3</sub> está ausente o es C, preferiblemente el primer tramo de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' GCGUG 3' y el segundo tramo de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' UACGC 3'.
- 40 En una realización de cualquiera del primer al décimo aspecto, la molécula de ácido nucleico tiene una secuencia de ácidos nucleicos según cualquiera de SEQ ID NOs 46 a 56, 61 a 72, y 132.
- En una realización de cualquiera del primer al décimo aspecto, las moléculas de ácido nucleico de tipo C comprenden una secuencia de nucleótidos una secuencia de nucleótidos central de GGUYAGGGCUHRX<sub>A</sub>AGUCGG (SEQ ID NO: 90), en la que X<sub>A</sub> está ausente o es A.
- 45 En una realización de cualquiera del primer al décimo aspecto, las moléculas de ácido nucleico de tipo C comprenden una secuencia de nucleótidos central del grupo que comprende
- 5' GGUYAGGGCUHRAAGUCGG 3' (SEQ ID NO: 91)
- 5' GGUYAGGGCUHRAGUCGG 3' (SEQ ID NO: 92), y
- 5' GGUJAGGGCUHGAAGUCGG 3' (SEQ ID NO: 93), preferiblemente la secuencia de nucleótidos central
- 50 comprende 5' GGUJAGGGCUHGAAGUCGG 3' (SEQ ID NO: 93).

## ES 2 768 051 T3

- En una realización de cualquiera del primer al décimo aspecto, la molécula de ácido nucleico comprende un primer tramo de nucleótidos en dirección 5'→3', la secuencia de nucleótidos central, y un segundo tramo de nucleótidos.
- En una realización de cualquiera del primer al décimo aspecto, la molécula de ácido nucleico comprende el segundo tramo de nucleótidos en dirección 5'→3', la secuencia de nucleótidos central, y un primer tramo de nucleótidos.
- 5 En una realización de cualquiera del primer al décimo aspecto, la molécula de ácido nucleico comprende el primer y el segundo tramo de nucleótidos y al menos una parte de dicho primer tramo y al menos una parte de dicho segundo tramo de nucleótidos hibridan opcionalmente el uno con el otro, mediante el cual se forma una estructura de doble cadena en la hibridación.
- 10 En una realización de cualquiera del primer al décimo aspecto, la longitud del primer tramo y la longitud del segundo tramo es individual e independiente de 0 a 17 nucleótidos, preferiblemente de 4 a 10 nucleótidos y más preferiblemente de 4 a 6 nucleótidos.
- En una realización de cualquiera del primer al décimo aspecto, la estructura de doble cadena comprende de 4 a 10 pares de bases, preferiblemente de 4 a 6 pares de bases, más preferiblemente 5 pares de bases.
- 15 En una realización de cualquiera del primer al décimo aspecto, la estructura de doble cadena comprende de 4 a 10 pares de bases consecutivas, preferiblemente de 4 a 6 pares de bases consecutivas, más preferiblemente 5 pares de bases consecutivas.
- 20 En una realización de cualquiera del primer al décimo aspecto, el primer tramo de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' RKSBUSNVGR 3' (SEQ:ID: 120), y el segundo tramo de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' YYNRCASSMY 3' (SEQ ID NO: 121), preferiblemente el primer tramo de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' RSKBUGSVGR 3' (SEQ ID NO: 122) y el segundo tramo de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' YCNRCASSMY 3' (SEQ ID NO: 123).
- En una realización de cualquiera del primer al décimo aspecto, el primer tramo de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' XsSSSV 3' (SEQ:ID NO: 124), y el segundo tramo de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' BSSXs' (SEQ ID NO: 125), en la que Xs está ausente o es S.
- 25 En una realización de cualquiera del primer al décimo aspecto, el primer tramo de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' SSSSR 3' (SEQ:ID: 130), y el segundo tramo de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' YSBSS' (SEQ ID NO: 131), preferiblemente el primer tramo de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' SGGSR 3' (SEQ ID NO: 126) y el segundo tramo de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' YSCC 3' (SEQ ID NO: 127).
- 30 En una realización de cualquiera del primer al décimo aspecto, el primer tramo de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' GCSGG 3' (SEQ ID NO: 128), y el segundo tramo de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' CCKGC' (SEQ ID NO: 129), preferiblemente el primer tramo de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' GCCGG 3' y el segundo tramo de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' CCGGC 3'.
- 35 En una realización de cualquiera del primer al décimo aspecto, el primer tramo de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' CGUGCGCUUGAGAUAGG 3', y el segundo tramo de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' CUGAUUCUCACG 3'.
- 40 En una realización de cualquiera del primer al décimo aspecto, el primer tramo de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' UGAGAUAGG 3', y el segundo tramo de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' CUGAUUCUCA 3'.
- En una realización de cualquiera del primer al décimo aspecto, el primer tramo de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' GAGAUAGG3', y el segundo tramo de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' CUGAUUCUC 3'.
- 45 En una realización de cualquiera del primer al décimo aspecto, la molécula de ácido nucleico tiene una secuencia de ácidos nucleicos según cualquiera de SEQ ID NOs 79 a 89, 94 a 119, y 134 a 136.
- En una realización de cualquiera del primer al décimo aspecto, la molécula de ácido nucleico tiene una secuencia de ácidos nucleicos según cualquiera de SEQ ID NOs 142 a 144.
- En una realización de cualquiera del primer al décimo aspecto, la molécula de ácido nucleico es un antagonista de SDF-1.
- 50 En una realización de cualquiera del primer al décimo aspecto, la molécula de ácido nucleico es un antagonista del sistema receptor de SDF-1, en el que el receptor de SDF-1 del sistema receptor de SDF-1 se selecciona preferiblemente de CXCR4 y CXCR7.

En una realización de cualquiera del primer al décimo aspecto, la SDF-1 es humana y/o el receptor SDF-1 del sistema receptor de SDF-1 es receptor de SDF-1 humano.

En una realización de cualquiera del primer al décimo aspecto, SDF-1 comprende una secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO: 1.

5 En una realización de cualquiera del primer al décimo aspecto, el ácido nucleico comprende una modificación.

En una realización de cualquiera del primer al décimo aspecto, la modificación se selecciona del grupo que comprende una fracción HES y una fracción PEG.

10 En una realización de cualquiera del primer al décimo aspecto, la modificación es una fracción PEG que consiste en un PGE lineal o ramificado, en el que el peso molecular de la fracción PEG es preferiblemente de aproximadamente 2 a 180 kD, más preferiblemente de aproximadamente 60 a 140 kD y lo más preferiblemente de aproximadamente 40 kD.

En una realización de cualquiera del primer al décimo aspecto, la modificación es una fracción HES, en la que preferiblemente el peso molecular de la fracción HES es de aproximadamente 10 a 130 kD, más preferiblemente de 30 a 130 kD y lo más preferiblemente aproximadamente 100 kD.

15 En una realización de cualquiera del primer al décimo aspecto, los nucleótidos del ácido nucleico son nucleótidos L-, preferiblemente los nucleótidos de las secuencias según cualquiera de SEQ ID NO: 19, 20, 21, 22, 57, 58, 90, 91, 92 y 93.

20 Se describe también una composición farmacéutica que comprende un ácido nucleico según el primer aspecto y cualquiera de las realizaciones del mismo, y opcionalmente al menos otro constituyente, en el que el constituyente se selecciona del grupo que comprende excipientes aceptables farmacéuticamente y agentes activos farmacéuticamente.

Como se define en las reivindicaciones, la presente invención se relaciona al empleo de un ácido nucleico según el primer aspecto y de cualquiera de las realizaciones del mismo, para la fabricación de un medicamento.

25 El medicamento se emplea para la movilización de células progenitoras y/o células madre en la sangre periférica y/o para el tratamiento de enfermedades y/o trastornos preferiblemente seleccionados del grupo que comprende cicatrización de heridas; quemaduras; trastornos causados o asociados con un tejido de un órgano dañado y/o vasculatura dañada, en el que tales trastornos se seleccionan de daño retiniano y corioideo, accidente cerebrovascular, daño de miocardio, infarto de miocardio, isquemia después del trasplante y de lesión traumática; y trastornos hematopoyéticos, en el que tales trastornos se seleccionan de anemia aplásica, leucemia, anemia inducida por fármacos y leucopenia, e infección bacteriana en leucopenia.

30 El medicamento es para la movilización de células cancerosas en la sangre periférica de un sujeto.

En una realización las células cancerosas se seleccionan de células leucémicas, células de linfoma, células madre cancerosas, células cancerosas con metástasis potencial y metástasis de cáncer.

35 En una realización el medicamento se emplea en combinación con un segundo agente activo farmacéuticamente, en el que el segundo agente activo farmacéuticamente es adecuado para la movilización de células cancerosas a la sangre periférica de un sujeto, en el que el segundo agente activo farmacéuticamente se selecciona preferiblemente de agentes movilizadores de células cancerosas.

40 En una realización el medicamento se emplea en combinación con un tercer agente activo farmacéuticamente, en el que el tercer agente activo farmacéuticamente daña, destruye y/o marca las células cancerosas en la sangre periférica, en el que el marcado conduce a una activación de las defensas del organismo.

En una realización un sujeto se somete previa o simultáneamente a quimioterapia y/o radioterapia.

En una realización el medicamento se emplea para el tratamiento y/o prevención del cáncer, preferiblemente de tumores sólidos y cáncer hematológico, más preferiblemente leucemia, linfoma, y mieloma.

45 En una octava realización del tercer aspecto el medicamento es para la movilización de células plasmáticas de vida larga, células B y/o células T en la sangre periférica de un sujeto, en el que preferiblemente las células B y/o las células T son células B de memoria y/o células T de memoria.

50 En una realización el medicamento se emplea en combinación con un segundo agente activo farmacéuticamente, en el que el segundo agente activo farmacéuticamente se emplea para la movilización de células plasmáticas de vida larga, células B y/o células T de memoria en la sangre periférica de un sujeto, en el que el segundo agente activo farmacéuticamente se selecciona preferiblemente de agentes movilizadores de células.

En una realización el medicamento se emplea en combinación con un tercer agente activo farmacéuticamente y el tercer agente activo farmacéuticamente daña, destruye y/o marca células plasmáticas de vida larga, células B y/o células T de memoria en la sangre periférica, en el que el marcado conduce a la activación de las defensas del organismo.

- 5 En una realización el sujeto se somete posterior o simultáneamente a quimioterapia y/o radioterapia.

En una realización el medicamento es para la inhibición de la migración de leucocitos.

En una realización el medicamento es para la prevención y/o el tratamiento de rechazo a trasplantes de órganos trasplantados, tal como hígado, riñón, intestino, pulmón, corazón, piel, extremidades, córnea, islotes de Langerhans, médula ósea, vasos sanguíneos y páncreas.

- 10 En una realización el medicamento se emplea para el tratamiento y/o prevención de la inflamación que aparece o se asocia con

enfermedades autoinmunes sistémicas en las que tal enfermedad autoinmune sistémica se selecciona preferiblemente de alergia, anemia hemolítica autoinmune de tipo caliente o fría, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, shock hemorrágico, diabetes de tipo 1, escleroderma difusa, policondritis, síndrome autoinmune poliglandular, lupus eritematoso sistémico y manifestaciones del mismo, artritis reumatoide, enfermedad reumática en el ojo, cerebro, pulmón, riñones, corazón, hígado, tracto gastrointestinal, bazo, piel, huesos, sistema linfático, sangre y otros órganos;

- 15

enfermedades autoinmunes del tracto gastrointestinal en las que tal enfermedad autoinmune del tracto gastrointestinal se selecciona preferiblemente de enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad celíaca, intolerancia al gluten, enfermedad intestinal inflamatoria, pancreatitis, esofagitis eosinofílica;

- 20

enfermedades autoinmunes cutáneas en las que tal enfermedad autoinmune cutánea se selecciona preferiblemente de psoriasis, urticaria, dermatomiositis, pénfigo vulgar, pénfigo foliáceo, penfigoide bulloso, escleroderma morfea/lineal, vitíligo, dermatitis herpetiforme o enfermedad de Duhring, líquen escleroso;

- 25

enfermedades autoinmunes de la vasculatura en la que tal enfermedad autoinmune de la vasculatura se selecciona preferiblemente de vasculitis, preferiblemente arteritis de la temporal, vasculitis, derrame vascular, polimialgia reumática, ateroesclerosis, síndrome de Churg-Strauss, arteritis Takayasu, síndrome Goodpasture, preferiblemente que afecte sobre todo a los riñones, más específicamente los glomérulos, y/o que afecte también a los pulmones, glomerulonefritis, poliarteritis nodosa, enfermedad de Behcet;

- 30

enfermedades autoinmunes del sistema nervioso en la que tal enfermedad autoinmune del sistema nervioso se selecciona preferiblemente de esclerosis múltiple, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, disfunción neurocognitiva, síndrome de la persona rígida (stiffman), síndrome de Guillain-Barré, miastenia gravis, síndrome de Lambert-Eaton;

- 35

enfermedades autoinmunes de los músculos esqueléticos en la que tal enfermedad autoinmune de los músculos esqueléticos se selecciona preferiblemente de espondilitis anquilosante, sarcoidosis, polimialgia reumática, polimiositis, artritis psoriásica, fiebre reumática, policondritis, fibromialgia, artritis reumatoide juvenil, enfermedad de Lyme, artritis reactiva, espondiloartropatía, enfermedad articular degenerativa;

- 40

y otras enfermedades autoinmunes en la que tales otras enfermedades autoinmunes se seleccionan preferiblemente del síndrome de Cogan, adrenalitis autoinmune, enfermedad de Ménière, inflamaciones locales, alopecia areata, enfermedades inflamatorias agudas, cirrosis biliar primaria, síndrome de Sjörgen, escleroderma tal como escleroderma difusa, síndrome CREST y/o escleroderma morfea/lineal, uveítis autoinmune, tiroiditis Hashimoto, enfermedad de Graves, hepatitis autoinmune, glomerulonefritis, síndrome anti-fosfolípidos, fibrosis pulmonar idiopática, infertilidad autoinmune, trastornos complejos autoinmunes y peritonitis.

- 45

En una realización el medicamento es para el tratamiento y/o prevención de reacciones alérgicas de la piel y/o de la mucosa de vías respiratorias, preferiblemente fiebre del heno, asma, hiper capacidad de respuesta de las vías aéreas y/o dermatitis.

En una realización la dermatitis es dermatitis de contacto y/o dermatitis atópica. Se describe también un método para obtener células progenitoras y/o células madre a partir de un primer sujeto cuyo método comprende

- 50

a) administrar al sujeto un ácido nucleico según el primer aspecto y cualquiera de las realizaciones del mismo, en una cantidad eficaz para movilizar dichas células progenitoras y/o células madre en la sangre periférica de dicho sujeto;

b) seguido del cultivo de dichas células progenitoras y/o células madre a partir de dicho sujeto.

En un ejemplo el cultivo de células progenitoras y/o células madre se realiza mediante aféresis, leucaféresis, clasificación de células y/o citometría de flujo.

- En un ejemplo el primer sujeto o un segundo sujeto se somete posterior o simultáneamente a quimioterapia y/o radioterapia.
- 5 En un ejemplo, después de la quimioterapia y/o radioterapia del primer sujeto o del segundo sujeto las células progenitoras y/o células madre cultivadas del primer sujeto o del segundo sujeto se administran en la sangre periférica del primer sujeto o del segundo sujeto.
- En un ejemplo las células progenitoras y/o células madre cultivadas se expanden y las células progenitoras y/o células madre expandidas se administran al primer sujeto o al segundo sujeto, en las que las células progenitoras y/o células madre preferiblemente se administran mediante inyección intravenosa o inyección local.
- 10 En un ejemplo el método se emplea para el tratamiento del cáncer, preferiblemente tumores sólidos y neoplasias hematológicas.
- Se describe también un método para la reducción de células plasmáticas de vida larga, células B y/o células T de un sujeto cuyo método comprende
- 15 a) administrar al sujeto un ácido nucleico según el primer aspecto y cualquiera de las realizaciones del mismo, en una cantidad eficaz para movilizar dichas células plasmáticas de vida larga, células B y/o células T de memoria en la sangre periférica de dicho sujeto;
- b) seguido del cultivo de dichas células plasmáticas de vida larga, células B y/o células T de memoria en la sangre periférica de dicho sujeto;
- en el que preferiblemente las células T reducidas y cultivadas son células T de memoria.
- 20 En un ejemplo, el cultivo de células plasmáticas de vida larga, células B y/o células T se realiza mediante aféresis, clasificación de células y/o citometría de flujo, preferiblemente mediante citometría de flujo con marcadores de superficie adecuados para dichas células.
- En un ejemplo, el método se emplea en el tratamiento y/o prevención de
- 25 enfermedades autoinmunes sistémicas en las que tal enfermedad autoinmune sistémica se selecciona preferiblemente de alergia, anemia hemolítica autoinmune de tipo caliente o fría, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, shock hemorrágico, diabetes de tipo 1, escleroderma difusa, policondritis, síndrome autoinmune poliglandular, lupus eritematoso sistémico y manifestaciones del mismo, artritis reumatoide, enfermedad reumática en el ojo, cerebro, pulmón, riñones, corazón, hígado, tracto gastrointestinal, bazo, piel, huesos, sistema linfático, sangre y otros órganos;
- 30 enfermedades autoinmunes del tracto gastrointestinal en las que tal enfermedad autoinmune del tracto gastrointestinal se selecciona preferiblemente de enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad celíaca, intolerancia al gluten, enfermedad intestinal inflamatoria, pancreatitis, esofagitis eosinofílica;
- enfermedades autoinmunes cutáneas en las que tal enfermedad autoinmune cutánea se selecciona preferiblemente de psoriasis, urticaria, dermatomiositis, pénfigo vulgar, pénfigo foliáceo, pénfigoide bulloso, escleroderma morfea/lineal, vitiligo, dermatitis herpetiforme o enfermedad de Dühring, líquen escleroso;
- 35 enfermedades autoinmunes de la vasculatura en la que tal enfermedad autoinmune de la vasculatura se seleccionan preferiblemente de vasculitis, preferiblemente arteritis de la temporal, vasculitis, derrame vascular, polimialgia reumática, aterosclerosis, síndrome de Churg-Strauss, arteritis Takayasu, síndrome Goodpasture, preferiblemente que afecte sobre todo a los riñones, más específicamente los glomérulos, y/o que afecte también a los pulmones, glomerulonefritis, poliarteritis nodosa, enfermedad de Behcet;
- 40 enfermedades autoinmunes del sistema nervioso en la que tal enfermedad autoinmune del sistema nervioso se selecciona preferiblemente de esclerosis múltiple, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, disfunción neurocognitiva, síndrome de la persona rígida (stiffman), síndrome de Guillain-Barré, miastenia gravis, síndrome de Lambert-Eaton;
- 45 enfermedades autoinmunes de los músculos esqueléticos en la que tal enfermedad autoinmune de los músculos esqueléticos se selecciona preferiblemente de espondilitis anquilosante, sarcoidosis, polimialgia reumática, polimiositis, artritis psoriásica, fiebre reumática, policondritis, fibromialgia, artritis reumatoide juvenil, enfermedad de Lyme, artritis reactiva, espondiloartropatía, enfermedad articular degenerativa;
- 50 y otras enfermedades autoinmunes en la que tales otras enfermedades autoinmunes se seleccionan preferiblemente del síndrome de Cogan, adrenalitis autoinmune, enfermedad de Ménière, inflamaciones locales, alopecia areata, enfermedades inflamatorias agudas, cirrosis biliar primaria, síndrome de Sjörgen, escleroderma tal como escleroderma difusa, síndrome CREST y/o escleroderma morfea/lineal, uveítis autoinmune, tiroiditis Hashimoto, enfermedad de Graves, hepatitis autoinmune, glomerulonefritis, síndrome anti-fosfolípidos, fibrosis pulmonar idiopática, infertilidad autoinmune, trastornos complejos autoinmunes y peritonitis;

rechazo a trasplantes de órganos trasplantados, tal como hígado, riñón, intestino, pulmón, corazón, piel, extremidades, córnea, islotes de Langerhans, médula ósea, vasos sanguíneos y páncreas;

y/o la enfermedad de injerto contra huésped después del trasplante de médula ósea.

- 5 Se describe también el empleo de un ácido nucleico como el que se define en cualquiera de las realizaciones del primer aspecto para la fabricación de un medicamento, en el que el medicamento es para el tratamiento y/o prevención de la fibrosis, preferiblemente la fibrosis pulmonar idiopática.

En un ejemplo del décimo aspecto el medicamento es para el tratamiento y/o prevención de la fibrosis dentro de un proceso de cicatrización de heridas.

- 10 En una realización del octavo aspecto, el medicamento se emplea para la terapia de combinación con un agente que inhibe VEGF.

En una realización del octavo aspecto, el medicamento se emplea en sujetos que responden débilmente a la terapia con un agente que inhibe VEGF.

En una realización del octavo aspecto, el medicamento se emplea en sujetos que no responden a la terapia con un agente que inhibe VEGF.

- 15 En una realización del octavo aspecto, la enfermedad y/o trastorno se implica y/o se asocia con neovascularización coroidea.

En una realización del octavo aspecto, la enfermedad y/o trastorno se selecciona del grupo que comprende enfermedades retinianas, preferiblemente la degeneración macular asociada a la edad, retinopatía diabética, oclusión de la vena retiniana, edema macular y edema retiniano.

- 20 En una enfermedad del octavo aspecto, la enfermedad se selecciona del grupo que comprende cáncer, preferiblemente tumores sólidos y metástasis.

En una realización de la invención como se define en las reivindicaciones el medicamento a administrar a un sujeto que se somete o se va a someter a un régimen de tratamiento reduce células progenitoras y/o células madre en el sujeto, preferiblemente la reducción en la sangre periférica.

- 25 En una realización de la invención como se define en las reivindicaciones el medicamento es para administrarse a un sujeto que se somete o se va a someter a quimioterapia y/o radioterapia.

En una realización de la invención como se define en las reivindicaciones el medicamento es para la restauración o mejora de un sistema inmune en un sujeto.

- 30 Se describe también una molécula que inhibe la señalización entre SDF-1 y el receptor de SDF-1 para la fabricación de un medicamento, en el que el medicamento es para el tratamiento y/o la prevención de la nefropatía, preferiblemente de la nefropatía diabética.

En un ejemplo la molécula es una molécula de unión a SDF-1 o a una molécula que se une al receptor de SDF-1 y que comprende ácidos nucleicos que se unen a la diana como aptámeros y Spiegelmeros, anticuerpos y moléculas pequeñas.

- 35 En un ejemplo la molécula es una molécula de ácido nucleico como se define en la décima a la 57ª realización del primer aspecto.

En un ejemplo la molécula es una molécula que inhibe la expresión de SDF-1 o del receptor de SDF-1 y comprende moléculas ARNsi, ribozimas, moléculas antisentido e inhibidores de factores de transcripción.

- 40 Se describe también una molécula de ácido nucleico según cualquier realización del primer aspecto para uso en un método para inhibir la migración de leucocitos.

Se describe también una molécula de unión de SDF-1 que no atraviesa la barrera hemato-encefálica para uso en la movilización de la médula ósea derivada de células madre o para uso en la fabricación de un medicamento, preferiblemente un medicamento para la movilización de células madre derivadas de médula ósea.

- 45 En un ejemplo el medicamento se emplea para la mejora de un daño del sistema nervioso central y/o para la promoción de la reparación de un tejido después de un accidente cerebrovascular, preferiblemente un accidente cerebrovascular isquémico.

En un ejemplo la molécula de unión a SDF-1 comprende ácidos nucleicos que se unen a la diana seleccionados del grupo que comprende aptámeros, Spiegelmeros, anticuerpos y moléculas pequeñas.

En un ejemplo la molécula es una molécula de ácido nucleico como se define en cualquier realización del aspecto primero.

5 Se describe también el empleo de un ácido nucleico como se define en cualquier realización del primer aspecto para la fabricación de un medicamento, en el que el medicamento es para el tratamiento y/o prevención del crecimiento de metástasis del cáncer, y del crecimiento de neoplasias.

Aunque no se desea vincularse a ninguna teoría, los inventores de la presente invención asumen que las moléculas de ácido nucleico según la presente invención inhiben la unión de SDF-1 a su receptor SDF-1 y, por tanto, bien directa o indirectamente, influyen en la migración de las células, preferiblemente la migración de células de la sangre periférica a uno más tejidos y de un tejido a la sangre periférica.

10 Sin embargo, aunque no se desea vincularse a ninguna teoría, los inventores de la presente invención asumen que las moléculas de ácido nucleico según la presente invención que inhiben la unión de SDF-1 al receptor SDF-1, el receptor SDF-1 conduce a la migración de células progenitoras, células madre, células cancerosas, células plasmáticas de vida larga, células B y/o células T, preferiblemente mediante movilización, de los tejidos a la sangre periférica, mediante la inhibición de la interacción entre SDF-1 y el receptor SDF-1.

15 Además y nuevamente sin desear vincularse a ninguna teoría, los inventores de la presente invención asumen que las moléculas de ácido nucleico según la presente invención que inhiben la unión de SDF-1 a su receptor SDF-1 evitan la migración de leucocitos tal como linfocitos T, linfocitos B, monocitos, macrófagos, eosinófilos, neutrófilos, basófilos y/o células dendríticas y mastocitos, preferiblemente en tejidos como la piel o la mucosa, y preferiblemente ayudan a atenuar las enfermedades autoinmunes y las reacciones alérgicas de la piel y mucosas.

20 Además y aún sin desear vincularse a ninguna teoría, los inventores fueron capaces de demostrar que el empleo de agentes que inhiben SDF-1 similares a las moléculas de ácido nucleico según la presente invención se pueden emplear en el tratamiento de la nefropatía, preferiblemente la nefropatía diabética; la hipertensión, preferiblemente la hipertensión pulmonar; la fibrosis, preferiblemente la fibrosis pulmonar, y en el tratamiento de enfermedades y/o trastornos que implican la neovascularización, preferiblemente la neovascularización coroidea.

25 Como en las distintas enfermedades, las afecciones y trastornos que se pueden tratar o prevenir mediante el empleo de moléculas de ácido nucleico según la presente invención o composiciones, preferiblemente composiciones farmacéuticas que comprenden lo mismo, hay que reconocer que tales enfermedades, afecciones y trastornos son las que se describen en la presente memoria, incluyendo en particular las que se describen y establecen en la parte introductoria de la presente solicitud. En la medida de lo posible, los pasajes respectivos forman una parte integral  
30 de la presente divulgación enseñando la idoneidad de las moléculas de ácido nucleicos para la prevención y el tratamiento, respectivamente, de dichas enfermedades, afecciones, y trastornos.

En la medida de lo posible, los respectivos fragmentos forman una parte integral de la presente divulgación enseñando la idoneidad de las moléculas de ácido nucleico para la prevención y el tratamiento, respectivamente, de dichas enfermedades, afecciones y trastornos.

35 Después de la administración intravenosa de una molécula de ácido nucleico de unión a SDF-1, tal como NOX-A12-JE40, las células están en la sangre, en la que el efecto del ácido nucleico NOX-A12-JE40 que se a SDF-1 se vio después de realizar un recuento células de sangre entera empleando un hemocitómetro (véase el Ejemplo 10). Mientras que las células madre del sistema hematopoyético/células progenitoras hematopoyéticas representan sólo una pequeña fracción de células blancas sanguíneas movilizadas, hay otros tipos de células que se liberaron a la  
40 sangre. Entre éstas hay monocitos y granulocitos neutrófilos así como células madre/células progenitoras de un tejido comprometido, células madre mesenquimales, células B plasmáticas de vida larga, sin limitarse a estas células.

45 En base a estos resultados, los inventores concluyeron que la inhibición de la señalización de SDF-1 para el receptor de SDF-1 mediante la molécula de ácido nucleico de unión a SDF-1 según la presente invención conduce a influir en la migración de células. Las células expresan preferiblemente el receptor SDF-1.

Por consiguiente, el término migración como se emplea preferiblemente en la presente memoria se refiere a la migración y/o movimiento de un tejido a otro tejido, de un tejido a la sangre periférica y/o de la sangre periférica a un tejido. La migración de las células se puede controlar mediante un ensayo-TAX (migración in vitro) como se muestra en el Ejemplo 5 y/o empleando un hemocitómetro y un análisis como se muestra en el Ejemplo 10 (experimento in  
50 vitro). Adicionalmente, se puede realizar la inmunohistoquímica del tejido, en la que las células migradas se detectan mediante anticuerpos que se dirigen hacia marcadores de superficie específicos de células. Como se emplea en la presente memoria el término receptor de SDF-1, independientemente de si se emplea en plural o en singular, se refiere a cualquier receptor al que se une SDF-1. En la actualidad existen dos receptores conocidos, el CXCR4 (Godessart 2005) y el CXCR7 (Burns, Summers, et al., 2006) que se prefieren a los receptores que se unen a SDF-  
55 1.

Desarrollo de células sanguíneas. El desarrollo y maduración de células sanguíneas es un proceso complejo. Las células sanguíneas maduras se derivan de células precursoras hematopoyéticas, también referidas como células

progenitoras, y las células madre presentes en tejidos hematopoyéticos específicos que incluyen médula ósea. Dentro de estos entornos las células hematopoyéticas proliferan y se diferencian antes de entrar en la circulación. El receptor de quimioquina CXCR4 y su ligando natural SDF-1 parece ser importante en este proceso (Maekawa y Ishii 2000; Nagasawa 2000). Esto se ha demostrado mediante informes de que CXCR4 o SDF-1 en ratones genosuprimidos muestran defectos hematopoyéticos (Ma, Jones et al., 1998; Tachibana, Hirota et al., 1998; Zou, Kottmann et al., 1998). Se sabe también que las células progenitoras CD34+ expresan CXCR4 y requieren SDF-1 producido por las células estromales de la médula ósea para quimioatracción e injertos (Peled, Petit et al., 1999) y que in vitro, SDF-1 es quiotáctico tanto para células CD34+ (Aiuti, Webb et al., 1997; Viardot, Kronenwett et al., 1998) como para células progenitoras/madre (Jo, Rafii et al., 2000). SDF-1 es también un importante quimioatrayente, señalando a través del receptor CXCR4, para varias de otras células progenitoras simultáneas y células sanguíneas maduras que incluyen linfocitos T y monocitos (Bleul, Fuhlbrigge et al., 1996), linfocitos pro- y pre-B (Fedyk, Ryyan et al., 1999) y megacariocitos (Riviere, Subra et al., 1999; Abi-Younes, Sauty et al., 2000; Hodohara, Fujii et al., 2000; Majjka, Janowska-Wieczorek et al., 2000; Gear, Suttitanamongkol et al., 2001). Debido a la relación entre los distintos tipos de células y la implicación de SDF-1 y del receptor de SDF-1, los distintos tipos celulares pueden dirigirse actualmente mediante las moléculas de ácido nucleico según la presente invención.

Por tanto, en resumen, parece que SDF-1 es capaz de controlar el posicionamiento y la diferenciación de células que soportan receptores SDF-1, preferiblemente receptores CXCR4 si estas células son células madre, es decir, células que son CD34+, y/o células progenitoras que dan como resultado la formación de tipos diferenciados de colonias en respuesta a un estímulo particular; que pueden ser CD34+ o CD34-, o células que son un poco más diferenciadas.

Recientemente, se ha enfocado una considerable atención al número de células CD34+ movilizadas en el grupo de células progenitoras sanguíneas periféricas para trasplantes de células madre autólogas y aloinjertos. La población CD34+ se piensa que es el componente responsable principalmente de la mejora del tiempo de recuperación del tiempo mejorado después de quimioterapia y las células más responsables probablemente del injerto a largo plazo y de la restauración de la hematopoyesis (Croop, Crooper et al., 2000). El mecanismo por el cual las células CD34+ se re-injertan puede ser debido a los efectos quimiotácticos de SDF-1 sobre las células que expresan CXCR4 (Ponomaryov, Peled et al., 2000; Voermans, Kooi et al., 2001). Más recientemente, las células madre hematopoyéticas adultas mostraron ser capaces de restaurar el tejido cardíaco dañado de ratones (Jackson, Majjka et al., 2001; Kocher, Schuster et al., 2001).

Como se emplea preferiblemente en la presente memoria, el término células progenitoras se refiere a las células que, en respuesta a determinados estímulos, pueden formar células hematopoyéticas diferenciadas o células mieloides. La presencia de células progenitoras se puede ensayar mediante la capacidad de las células en la muestra para formar unidades formadoras de colonias, de varios tipos, que incluyen, por ejemplo, CFU-GM (que significa unidad formadora de colonias para granulocitos-macrófagos); HPP-CFC (que significa alta proliferación potencial de células formadoras de colonias); CFU-GEMM (que significa unidades formadoras de colonias, multipotenciales); BFU-E (unidades formadoras de colonias eritroides grandes y abundantes); HPP-CFC (que significa células formadoras de colonias de alto potencial de proliferación); u otros tipos de colonias diferenciadas que se pueden obtener en cultivo empleando protocolos conocidos.

Como se emplea preferiblemente en la presente memoria, las células madre son formas menos diferenciadas de células progenitoras. Normalmente, tales células son a menudo positivas para CD34. Algunas células madre no contienen este marcador, sin embargo las células CD34+ se pueden ensayar empleando clasificación de células activadas por fluorescencia (siglas FACS) y, por lo tanto, su presencia se puede ensayar en una muestra empleando esta técnica.

En general, las células CD34+ están presentes sólo en niveles bajos en la sangre, pero están presentes en grandes cantidades en médula ósea. Mientras que otros tipos de células tales como las células endoteliales y los mastocitos muestran también este marcador, CD34 se considera un índice de presencia de células madre.

Sin desear vincularse a ninguna teoría, los inventores han encontrado que además de células madre y/o células progenitoras, células cancerosas, células plasmáticas de vida larga, células T y/o células T también están afectadas por el efecto inhibitorio del ácido nucleico según la presente invención en la señalización entre SDF-1 y su receptor SDF-1. Las células B y las células T son preferiblemente células B de memoria y células T de memoria. La inhibición de la señalización entre SDF-1 y el receptor SDF-1 conduce a la migración, que comprende movilización, en la sangre periférica.

La movilización de células madre, células progenitoras, células cancerosas, células plasmáticas de vida larga, células T y/o células T tiene lugar preferiblemente en tejidos hematopoyéticos, en el que el tejido hematopoyético se selecciona del grupo que consiste en tejido mielode y tejido linfoide. El tejido linfoide se localiza en la médula ósea. El tejido linfoide se localiza en la mucosa del tracto digestivo y del tracto respiratorio, ganglios linfáticos, el bazo y/o el timo.

Como se emplea preferiblemente en la presente memoria, las células cancerosas son células neoplásicas y se seleccionan preferiblemente de células de mieloma, células de linfoma, células madre cancerosas, células

cancerosas con potencial metastásico y metástasis cancerosa. Las células neoplásicas normalmente tienen anomalías genéticas o epigenéticas comunes, una evidencia de clonación. Para algunos tipos de neoplasmas, por ejemplo, linfoma y leucemia, la clonación se considera en la actualidad como necesaria (aunque no suficiente) para definir una proliferación celular como neoplásica.

5 Después de una respuesta inmune aguda con producción de anticuerpos activos mediante células B diferenciadas finalmente (células plasmáticas) la mayoría de estas células mueren con la resolución de la enfermedad, y/o la eliminación del antígeno extraño (por ejemplo, proteína vírica). Sin embargo hay una minoría de células B de memoria que pueden convertirse en plasmablastos con la ayuda de una célula T. Estos plasmablastos tienen la capacidad de migrar en respuesta a un estímulo quimiotáctico en huesos donde sobreviven durante años como  
10 células plasmáticas de "memoria" de vida prolongada. Estos huesos pueden estar tanto en médula ósea como en la periferia, por ejemplo, en tejidos inflamados. Estas células plasmáticas de vida prolongada son probablemente responsables del mantenimiento de los títulos plasmáticos del anticuerpo protector que se mantienen a menudo durante años después de una infección o vacuna (Tarlinton et al, 2008).

15 La movilización de células progenitoras y/o células madre ocurre preferiblemente desde tejidos hematopoyéticos, en el que el tejido hematopoyético se selecciona del grupo del tejido mieloide y del tejido linfoide. El tejido mieloide se localiza en la médula ósea. El tejido linfoide se localiza en la mucosa del tracto digestivo y del tracto respiratorio, ganglios linfáticos, el bazo, el timo y los folículos lipoides en un tejido inflamado. Preferiblemente, la movilización de las células como se divulga anteriormente comprende la migración de las células como se describe antes en la sangre periférica.

20 Como se muestra anteriormente, se encontró que SDF-1 actúa como un agente quimiotáctico sobre células maduras y mastocitos precursores – especialmente cuando se libera histamina desde mastocitos maduros, por ejemplo, por IgE que señala a través de la unión al receptor Fc-epsilon en la superficie celular de mastocitos (Godot, Arock et al., 2007). Las enfermedades similares a las reacciones alérgicas de la piel y la mucosa de las vías aéreas, tal como fiebre del heno y asma, dermatitis, especialmente dermatitis de contacto y dermatitis atópica implican a menudo una migración leucocitaria y una acumulación en los tejidos afectados. La expresión de SDF-1 se observó también en  
25 biopsias sinoviales y mediante RT-PCR en sujetos afectados por inflamación articular como espondiloartropatía, artritis reumatoide, artritis psoriásica y enfermedad articular degenerativa (osteoartritis). La interferencia con SDF-1 mediante ácidos nucleicos que se unen a SDF-1 según la presente invención pueden, por lo tanto, tener efectos positivos en pacientes que padecen de inflamación articular.

30 Mediante estos medios y en vista de la implicación indicada de SDF-1 y de los receptores SDF-1, la unión de SDF-1 y la interacción entre SDF-1 y el receptor de SDF-1 que inhibe las moléculas de ácido nucleico según la presente invención pueden ayudar a atenuar tales enfermedades, en la que la inhibición de SDF-1 por las moléculas de ácido nucleico según la presente invención conducen a la reducción y/o inhibición de la migración de leucocitos en el que los leucocitos se seleccionan preferiblemente del grupo de linfocitos T, linfocitos B, monocitos, macrófagos,  
35 magacariocitos, eosinófilos, neutrófilos, basófilos, células dendríticas y/o mastocitos.

La migración de leucocitos conduce a la acumulación en un tejido, en el que preferiblemente la acumulación de los leucocitos conduce a una inflamación de dicho tejido, en el que el tejido comprende la piel y/o mucosa, preferiblemente la mucosa de vías respiratorias, y varios órganos como los seleccionados pero no restringidos a ojo, cerebro, pulmón, riñones, corazón, hígado, tracto gastrointestinal, bazo, piel, huesos y/o sistema linfático.

40 Un antagonista de SDF-1 es una molécula de unión a SDF-1 e inhibe la función de SDF-1, preferiblemente en un ensayo basado en células o en un modelo in vivo como se describe en los Ejemplos.

Por otra parte, la presente invención se basa en el sorprendente descubrimiento de que es posible generar ácidos nucleicos que se unen específicamente y con alta afinidad por SDF-1. Tales ácidos nucleicos son preferiblemente referidos también en la presente memoria como las moléculas de ácido nucleico según la presente invención, los  
45 ácidos nucleicos según la presente invención, los ácidos nucleicos inventivos o las moléculas de ácido nucleico inventivas.

SDF-1 es un péptido básico que tiene la secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO: 1. La pl calculada de SDF-1 es 9,70. Como se emplea en la presente memoria el término SDF-1 se refiere a cualquier SDF-1 que incluye, pero no se limita a, SDF-1 de mamíferos. Preferiblemente, la SDF-1 de mamíferos se selecciona del grupo que  
50 comprende SDF de ratones, rata, conejo, hámsteres, mono y seres humanos. Más preferiblemente la SDF-1 humana se refiere también como SDF-1α (SEQ ID NO: 1) y/o SDF-1β (SEQ ID NO: 2), lo más preferiblemente SDF-1 humana también es referida como SDF-1α (SEQ ID NO: 1).

El descubrimiento de que se podía identificar una alta afinidad de unión de ácidos nucleicos a SDF-1, se observó sorprendentemente por Eaton et al., (Eaton, Gold et al., 1997) en la generación de aptámeros, es decir, ácidos  
55 nucleicos-D que se unen a una molécula diana, dirigidos a una proteína básica es en general muy difícil porque este tipo de diana produce una alta relación entre la señal no específica y el ruido. Esta alta relación entre la señal y el ruido da como resultado una elevada afinidad no específica mostrada por ácidos nucleicos para dianas básicas tales como SDF-1.

Las características del ácido nucleico según la presente invención como se describe en la presente memoria se pueden obtener en cualquier aspecto de la presente invención donde se emplee el ácido nucleico, bien en solitario o en cualquier combinación.

5 Sin desear vincularse por ninguna teoría, los presentes inventores asumen que la especificidad observada de los ácidos nucleicos que se unen a SDF-1 según la presente invención comparten algunas características estructurales y en particular una de las secuencias de nucleótidos que se refieren en ella como secuencias centrales que se discutirán con más detalle a continuación, en la que se hace referencia en las Figuras 1 a la 8 y en el Ejemplo 1. Sin embargo, se entiende que dichas Figuras y Ejemplo 1 incorpora varias de dichas características estructurales que no se tienen que realizar necesariamente en cada una de cualquiera de los ácidos nucleicos según la presente  
10 invención.

Como se indica con más detalle en las reivindicaciones y en el Ejemplo 1, las distintas moléculas de ácido nucleico que se unen a SDF-1 se pueden catalogar en base a dichas Cajas y algunas características y elementos estructurales, respectivamente. Las distintas categorías definidas también se refieren, por tanto, en la presente memoria como tipos y más específicamente como Tipo A, Tipo B y Tipo C.

15 En una realización preferida el ácido nucleico según la presente invención es una molécula de ácido nucleico en solitario. En otra realización, la molécula de ácido nucleico en solitario está presente como una multitud de moléculas de ácido nucleico. Preferiblemente, los términos ácido nucleico y molécula de ácido nucleico se emplean de una manera intercambiable en la presente memoria si no se indica lo contrario.

20 Se reconoce por los expertos en la técnica que la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención consiste preferiblemente en nucleótidos que se unen covalentemente los unos a los otros, preferiblemente a través de los enlaces o vínculos fosfodiéster.

Los ácidos nucleicos objeto de la invención como se definen en las reivindicaciones comprenderán también ácidos nucleicos que son esencialmente homólogos a secuencias particulares descritas en la presente memoria. El término sustancialmente homólogo se entenderá tal como que la homología es de al menos el 75%, preferiblemente 86%,  
25 más preferiblemente 90% y lo más preferiblemente más de 95%, 96%, 97%, 98% o 99%.

El porcentaje actual de nucleótidos homólogos presentes en el ácido nucleico según la presente invención dependerá del número total de nucleótidos presentes en el ácido nucleico. El porcentaje de modificación se puede basar en el número total de nucleótidos presentes en el ácido nucleico.

30 La homología se puede determinar cómo conoce el experto en la técnica. Más específicamente, un algoritmo de comparación de secuencias calcula después el porcentaje de identidad de secuencia para la secuencia o secuencias ensayadas en relación a la secuencia de referencia, en base a los parámetros del programa designado. La secuencia de ensayo es preferiblemente la secuencia o la molécula de ácido nucleico que es o se considera que es homóloga, y si lo es, en qué medida, para otra molécula de ácido nucleico, en la que tal otra molécula de ácido nucleico también se refiere como la secuencia de referencia. En una realización, la secuencia de referencia es una  
35 molécula de ácido nucleico como se describe en la presente memoria, más preferiblemente una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia según cualquiera de SEQ ID Nos 5 a 144. El alineamiento óptimo de las secuencias para la comparación se puede realizar, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (Smith y Waterman, 1981) mediante el algoritmo de alineación de Needleman y Wunsch, (Needleman y Wunsch, 1970) mediante la búsqueda del método de similitud de Pearson y Lipman (Pearson y Lipman, 1988)  
40 mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el Paquete Informático Wisconsin Genetics; Grupo Genetics Computer, 575 Science, Dr., Madison, Wis), o mediante inspección visual.

Un ejemplo de un algoritmo que es adecuado para determinar el porcentaje de identidad de la secuencia es el algoritmo empleado en la herramienta de búsqueda de alineación local (de aquí en lo sucesivo "BLAST"), véase, por  
45 ejemplo, Altschul et al (Altschul et al. 1990 y Altschul et al, 1997). El programa informático para la realización de análisis BLAST está disponible públicamente a través del Centro Nacional para Información Biotecnológica (de aquí en lo sucesivo "NCBI"). Los parámetros por defecto empleados en determinar la identidad de secuencia empleando el programa informático disponible en NCBI, por ejemplo, BLASTN (para secuencias de nucleótidos) y BLASTP (para secuencias de aminoácidos) se describen en McGinnis et al (McGinnis et al, 2004).

50 El término ácido nucleico inventivo o ácido nucleico objeto de la invención como se define en las reivindicaciones debe comprender también aquellos ácidos nucleicos que comprenden las secuencias de ácidos nucleicos descritos en la presente memoria o parte de los mismos, preferiblemente para extender los ácidos nucleicos o dichas partes están implicadas en la unión a SDF-1. Tal ácido nucleico puede derivarse de los descritos en la presente memoria, por ejemplo, mediante truncado. El truncado se puede relacionar a uno o a ambos extremos de los ácido nucleicos  
55 como se describe en la presente memoria. También, el truncado se puede relacionar a la secuencia interna de los nucleótidos, es decir, se puede relacionar al nucleótidos o nucleótidos entre el nucleótido terminal 5' y el 3', respectivamente. Por otra parte, el truncado debe comprender la delección de un nucleótido de la secuencia de los ácidos descritos en la presente memoria. El truncado puede relacionarse también a más de un tramo del ácido o

ácidos nucleicos inventivos, en el que el tramo puede ser tan pequeño como un nucleótido de longitud en solitario. La unión de un ácido nucleico según la presente invención se puede determinar por los expertos en la técnica empleando experimentos rutinarios o mediante el empleo de un método como el que se describe en la presente memoria, preferiblemente como se describe en la presente memoria en la parte de los ejemplos.

5 Los ácidos nucleicos objeto de la invención como se define en las reivindicaciones puede ser bien ácidos nucleicos D o ácidos L. Preferiblemente, los ácidos nucleicos son ácidos nucleicos L. Además si es posible uno o varias partes del ácido nucleico están presentes como ácidos nucleicos D o al menos uno o varias partes del ácido nucleico son ácidos nucleicos L, respectivamente. Por lo tanto, en una realización preferida particularmente, los ácidos nucleicos según la presente invención consisten en nucleótidos L y comprenden al menos un nucleótido D. Tal nucleótido D se  
10 une preferiblemente a una parte distinta de los tramos que definen los ácidos nucleicos según la presente invención, preferiblemente aquellas partes de los mismos, donde está implicada una interacción con otras partes del ácido nucleico. Preferiblemente, tal nucleótido D se une a un extremo de cualquiera de los tramos y de cualquier ácido nucleico según la presente invención, respectivamente. En otra realización preferida, tales nucleótidos D pueden actuar como un espaciador o un enlazador, que una preferiblemente modificaciones tales como PEG y HES a los  
15 ácidos nucleicos según la presente invención.

Está también dentro de la presente invención cada una y cualquiera de las moléculas de ácido nucleico descritas en la presente memoria en su totalidad en términos de que su secuencia o secuencias se limitan a la secuencia o secuencias de nucleótidos en particular. En otras palabras, los términos "que comprende" o "comprende o comprenden" se debe interpretar en tal realización en el significado de que contiene o consiste en.

20 Está también dentro de la presente invención que el ácido nucleico objeto de la invención como se define en las reivindicaciones son parte de un ácido nucleico más largo en el que este ácido nucleico más largo comprende varias partes en las que al menos una de tales partes es un ácido nucleico, o parte del mismo, según la presente invención. La otra parte o partes de este ácido nucleico más largo puede ser bien uno o bien varios ácidos nucleicos D o ácidos nucleicos L. Junto con la presente invención se puede emplear cualquier combinación. Esta otra parte o partes del  
25 ácido nucleico más largo puede mostrar una función que es distinta a la de unir, preferiblemente de la de unión a SDF-1. Una posible función es permitir la interacción con otras moléculas, en las que tales otras moléculas son preferiblemente diferentes a SDF-1, tal como, por ejemplo, para la movilización, entrecruzamiento, detección o amplificación. En otra realización de la presente invención los ácidos nucleicos según la invención comprenden, como fracciones individuales o combinadas, varios ácidos nucleicos de la presente invención. Tal ácido nucleico que  
30 comprende varios de los ácidos nucleicos de la presente invención se engloba también por el término de ácido nucleico más largo.

Los ácidos nucleicos L empleados en la presente memoria son ácidos nucleicos que consisten en nucleótidos L, que preferiblemente consisten en nucleótidos L completamente.

35 Los ácidos nucleicos D empleados en la presente memoria son ácidos nucleicos que consisten en nucleótidos D, que preferiblemente consisten en nucleótidos D completamente.

Los términos ácido nucleico y molécula de ácido nucleico se emplean en la presente memoria de una manera intercambiable sino se indica explícitamente lo contrario.

También, si no se indica lo contrario, cualquier secuencia de nucleótidos se establece en la presente memoria en dirección 5'→3'.

40 Independientemente de si el ácido nucleico inventivo consiste de nucleótidos D, nucleótidos L o una combinación de ambos con la combinación siendo, por ejemplo, una combinación aleatoria o una secuencia definida de tramos que consisten en al menos un nucleótido L y al menos un ácido nucleico D, el ácido nucleico puede consistir en desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos o una combinación de los mismos.

45 Designar los ácidos nucleicos inventivos como ácido nucleico L es ventajoso por varias razones. Los ácidos nucleicos L son enantiómeros de ácido nucleicos que aparecen de manera natural. Los ácidos nucleicos D, sin embargo, no son muy estables en disoluciones acuosas y particularmente en sistemas biológicos o muestras biológicas debido a la amplia presencia de nucleasas. Las nucleasas aparecen de manera natural, en particular las nucleasas de células animales que no son capaces de degradar los ácidos nucleicos L. Por ello, la vida media biológica del ácido nucleico L se incrementa significativamente en tal sistema, incluyendo el animal y el cuerpo humano. Debido a la falta de degradabilidad del ácido nucleico L no se generan productos de degradación por la  
50 nucleasa, y por tanto, no se observan los consiguientes efectos adversos. Este aspecto delimita el ácido nucleico L de otros compuestos que se emplean en la terapia de enfermedades y/o trastornos que implican la presencia de SDF-1. Los ácidos nucleicos L que se unen específicamente a una molécula diana a través de un mecanismo diferente al del emparejamiento de bases de Watson Crick, o aptámeros que consisten parcial o completamente en  
55 nucleótidos L, particularmente con aquellas partes del aptámero que están implicadas en la unión del aptámero a la molécula diana, también se denominan spiegelmeros.

Está dentro de la presente invención que el primer y el segundo tramo de nucleótidos que flanquean a la secuencia central de nucleótidos puedan, en principio, hibridar el uno con el otro. En tal hibridación se forma una estructura

bicatenaria. Será reconocido por el experto en la técnica que tal hibridación puede ocurrir o no, particularmente bajo condiciones in vitro y/o in vivo. También, en caso de tal hibridación, no es necesario el caso de que la hibridación ocurra a lo largo de la longitud completa de los dos tramos donde, al menos en base a las reglas de apareamiento de bases, puede ocurrir tal hibridación, y por tanto, una parte de la molécula o una estructura formada por dos o más hebras separadas, en la que la última, preferiblemente existen dos o más pares de bases que son bases que se emparejan preferiblemente de acuerdo con las reglas de emparejamiento de Watson-Crick. Será reconocido también por el experto en la técnica que puede haber otro emparejamiento de bases tal como el emparejamiento de Hoogsten o formar una estructura bicatenaria.

Está también dentro de la presente invención que los ácidos nucleicos inventivos, independientemente de si están presentes como ácidos nucleicos D, ácidos nucleicos L o ácidos nucleicos D, L o si son ADN o ARN, se pueden presentar como ácidos nucleicos monocatenarios o bicatenarios. Normalmente, los ácidos nucleicos inventivos son ácidos nucleicos monocatenarios que muestran estructuras secundarias definidas debido a la secuencia primaria y, por tanto, pueden formar estructuras terciarias. Sin embargo, los ácidos nucleicos inventivos pueden ser también bicatenarios en el significado de que dos hebras que son complementarias o parcialmente complementarias la una con la otra, hibridan entre sí. Esto confiere estabilidad al ácido nucleico que, en particular, será ventajoso si el ácido nucleico está presente en la forma D que aparece de manera natural y no en la forma L.

Los ácidos nucleicos objeto de la invención como se define en las reivindicaciones se pueden modificar. Tales modificaciones se pueden relacionar a los nucleótidos en solitario y son bien conocidos en la técnica. Ejemplos de tales modificaciones se describen, entre otros, por Venkatesan et al., (Venkatesan, Kim et al., 2003) y Kusser (Kusser 2000). Tal modificación puede ser un átomo H, un átomo F o grupo O-CH<sub>3</sub> o grupo NH<sub>2</sub> en la posición 2' del nucleótido individual de los que consiste el ácido nucleico. También, el ácido nucleico según la presente invención puede comprender al menos un nucleótido LNA. En una realización el ácido nucleico según la presente invención consiste en nucleótidos LNA.

En una realización, los ácidos nucleicos pueden ser un ácido nucleico multipartito. Un ácido nucleico multipartito como se emplea en la presente memoria, es un ácido nucleico que consiste en al menos dos hebras de ácido nucleico. Estas al menos dos hebras de ácido nucleico forman una unidad funcional en la que la unidad funcional es un ligando para una molécula diana. Las al menos dos hebras se pueden derivar a partir de cualquiera de los ácidos nucleicos inventivos bien mediante separación del ácido nucleico para generar dos hebras o bien mediante síntesis de un ácido nucleico que corresponde a una primera parte del ácido nucleico inventivo, es decir, un ácido nucleico general y otro ácido nucleico que corresponde a la segunda parte del ácido nucleico general. Se reconocerá que tanto la separación como la síntesis se puede aplicar para generar un ácido nucleico multipartito donde hay más de dos hebras como se ejemplifica anteriormente. En otras palabras, al menos dos hebras de ácido nucleico son diferentes normalmente de dos hebras que son complementarias e hibridan la una con la otra aunque puede existir una determinada extensión de complementariedad entre las diferentes partes del ácido nucleico.

Finalmente, está también dentro de la presente invención que se logre una estructura completamente cerrada, es decir, una estructura circular para los ácidos nucleicos según la presente invención, es decir, que los ácidos nucleicos según la presente invención se cierren, preferiblemente a través de un enlace covalente, en el que más preferiblemente tal enlace covalente se realice entre el extremo 5' y el extremo 3' de las secuencias de ácido nucleico como se describe en la presente memoria.

Los presentes inventores han descubierto que los ácidos nucleicos según la presente invención muestran un valor de intervalo K<sub>d</sub> favorable.

Una posibilidad para determinar la constante de unión es la medición por resonancia plasmónica de superficie mediante el empleo del llamado dispositivo Biacore (Biacore AB, Upssala, Suecia), que también es conocido por el experto en la técnica. La afinidad como se emplea preferiblemente en la presente memoria se midió también mediante el empleo del "ensayo de unión pull-down" como se describe en los ejemplos. Una medición apropiada para expresar la intensidad de la unión entre el ácido nucleico y la diana que en el presente caso es SDF-1, también denominado valor K<sub>d</sub> el cual es también el método para su determinación, son bien conocidos por el experto en la técnica.

Los ácidos nucleicos objeto de la invención como se define en las reivindicaciones se caracterizan por un determinado valor K<sub>d</sub>. Preferiblemente, el valor K<sub>d</sub> mostrado por los ácidos nucleicos según la presente invención está por debajo de 1 μM. Un valor K<sub>d</sub> de aproximadamente 1 μM se dice que es característico de una unión no específica de un ácido nucleico a una diana. Como será reconocido por los expertos en la técnica, el valor K<sub>d</sub> de un grupo de compuestos tal como los ácidos nucleicos según la presente invención están dentro de un determinado intervalo. La K<sub>d</sub> anteriormente mencionada de aproximadamente 1 μM es el límite máximo preferido para el valor de K<sub>d</sub>. El límite mínimo preferido para la K<sub>d</sub> de la unión de la diana a los ácidos nucleicos puede ser de aproximadamente 10 picomolar o superior. Está dentro de la presente invención que los valores K<sub>d</sub> de la unión de los ácidos nucleicos a grelina esté preferiblemente dentro de este intervalo. Se pueden definir intervalos preferidos mediante la elección de cualquier primer número dentro de este intervalo. Valores máximos preferidos son 250 nM y 100 nM, valores mínimos preferidos son 50 nM, 10 nM, 1 nM, 100 pM y 10 pM.

Las moléculas de ácidos nucleicos objeto de la invención como se definen en las reivindicaciones pueden tener cualquier longitud siempre y cuando sean capaces de unirse a la molécula diana. Se reconocerá en la técnica que hay longitudes preferidas de los ácidos nucleicos según las presentes invenciones. Normalmente, la longitud está entre 15 y 120 nucleótidos. Se reconocerá por los expertos en la técnica que cualquier número entero entre 15 y 120 es una posible longitud para los ácidos nucleicos según la presente invención. Intervalos más preferidos para la longitud de los ácidos nucleicos según la presente invención son longitudes de aproximadamente 20 a 100 nucleótidos, aproximadamente 20 a 80 nucleótidos, aproximadamente 20 a 60 nucleótidos, aproximadamente 20 a 50 nucleótidos y aproximadamente 20 a 40 nucleótidos.

Está dentro de la presente invención que los ácidos nucleicos comprenden una fracción que preferiblemente es una fracción de peso molecular alto y/o que permite preferiblemente modificar las características del ácido nucleico en términos de, entre otros, tiempo de permanencia en el organismo del animal, preferiblemente el organismo de un ser humano. Una realización preferida particularmente de tal modificación es la PEGilación y la HESilación de los ácidos nucleicos según la presente invención. Como se emplea en la presente memoria PEG representa poli(etilenglicol) y HES hidroxietil-almidón. En la presente memoria se emplea preferiblemente la PEGilación que es la modificación de un ácido nucleico según la presente invención en la que tal modificación consiste en una fracción de PEG que se une a un ácido nucleico según la presente invención. La HESilación como se emplea preferiblemente en la presente memoria es la modificación de un ácido nucleico según la presente invención en la que tal modificación consiste en una fracción de HES que se une a un ácido nucleico según la presente invención. Estas modificaciones así como el proceso de modificar un ácido nucleico empleando tales modificaciones, se describen en la solicitud de la Patente Europea EP 1 306 382, divulgación de la cual se incorpora en su totalidad por referencia.

Preferiblemente, el peso molecular de una modificación consiste o comprende de una fracción de peso molecular alto de aproximadamente 2.000 a 200.000 Da, preferiblemente de 40.000 a 120.000 Da, particularmente en el caso de que la fracción de peso molecular alto sea PEG, y es preferiblemente de aproximadamente 3.000 a 180.000 Da, más preferiblemente de 60.000 a 140.000 Da, particularmente en el caso de que la fracción de peso molecular alto sea HES. El proceso de modificación de HES se describe, por ejemplo, en la solicitud de la Patente Alemana DE 1 2004 006 249.8 divulgación de la cual se incorpora en su totalidad por referencia.

Está dentro de la presente invención que se pueda emplear tanto PEG y HES tanto lineal como ramificado como se describe en las solicitudes de patente WO2005074993 y PCT/EP02/11950. Tal modificación puede realizarse, en principio, a las moléculas de ácido nucleico de la presente invención en cualquier posición de los mismos. Preferiblemente tal modificación está bien en el nucleótido 5' terminal, en el nucleótido 3' terminal y/o en cualquier nucleótido entre el nucleótido 5' y el 3' de la molécula de ácido nucleico.

La modificación y preferiblemente la fracción PEG y/o HES se pueden unir a la molécula de ácido nucleico de la presente invención bien directamente o bien a través de un enlazante. Está también dentro de la presente invención que la molécula de ácido nucleico según la presente invención comprende una o más modificaciones, preferiblemente una más fracciones de PEG y/o HES. En una realización la molécula enlazadora individual une más de una fracción de PEG o una fracción HES a una molécula de ácido nucleico según la presente invención. El enlazante empleado junto con el la presente invención puede ser bien lineal o ramificado. Este tipo de enlazantes se conoce por los expertos en la técnica y se describen además en las solicitudes de patente WO2005074993 y PCT/EP02/11950.

Sin desear estar vinculado a ninguna teoría, parece que mediante la modificación de los ácidos nucleicos según la presente invención con una fracción de peso molecular alto, tal como un polímero y más particularmente los polímeros descritos en la presente memoria, que son preferiblemente aceptables fisiológicamente, la cinética de excreción cambia. Más particularmente, parece que debido al peso molecular aumentado de tales ácidos nucleicos inventivos modificados y debido a que los ácidos nucleicos no son sujeto del metabolismo particularmente cuando están en la forma L, la excreción de un organismo animal, preferiblemente de un animal mamífero y más preferiblemente de un organismo humano, disminuye. Normalmente la excreción ocurre a través de los riñones, los presentes inventores asumen que la tasa filtración glomerular, por tanto, se reduce significativamente en el ácido nucleico modificado comparado con los ácidos nucleicos que no tienen este tipo de modificación en el peso molecular que da como resultado un incremento en el tiempo de permanencia en el organismo. Junto con esto es destacable de manera particular que, a pesar de tal modificación del peso molecular alto la especificidad del ácido nucleico según la presente invención no se afecta de una manera perjudicial. En la medida de lo posible, los ácidos nucleicos según la presente invención tienen características sorprendentes - que normalmente no se esperan de compuestos activos farmacéuticamente - tal que una formulación farmacéutica que proporciona una liberación sostenida no se requiere necesariamente para proporcionar una liberación sostenida. En cambio, los ácidos nucleicos según la presente invención en su forma modificada que comprende una fracción de peso molecular alta, se puede emplear como tal como una forma de liberación sostenida. En la medida de lo posible, la modificación o modificaciones de las moléculas de ácido nucleico que se divulgan en la presente memoria y, por tanto, las moléculas de ácido nucleico y cualquier composición que comprenda lo mismo, se pueden proporcionar para una biodistribución distinta de las mismas, preferiblemente con farmacocinéticas controladas. Esto incluye también tiempo de permanencia en la circulación y distribución a los tejidos. Tales modificaciones se describen además en la solicitud de patente PCT/EP02/11950.

Sin embargo, está también dentro de la invención que los ácidos nucleicos descritos en la presente memoria comprenden cualquier modificación y particularmente modificaciones de peso molecular alto, tal como la PEGilación y la HESilación. Tal realización es particularmente preferida cuando se desea un aclaramiento de los ácidos nucleicos del cuerpo después de la administración. Tal aclaramiento rápido se podría desear en caso de toma de imágenes in vivo o en requerimientos de dosificación terapéuticos empleando ácidos nucleicos o medicamentos que comprenden lo mismo, según la presente invención.

Los ácidos nucleicos objeto de la presente invención como se definen en las reivindicaciones, que también se refieren en la presente memoria como ácidos nucleicos según la presente invención, y/o los antagonistas según la presente invención, se pueden emplear para la generación o fabricación de un medicamento. Tal medicamento contiene al menos uno de los ácidos nucleicos inventivos, opcionalmente junto con otros compuestos activos farmacéuticamente, en los que el ácido nucleico inventivo actúa preferiblemente como compuesto activo farmacéuticamente en sí mismo. Tales medicamentos comprenden en realizaciones preferidas comprenden al menos un vehículo aceptable farmacéuticamente. Tal vehículo puede ser, por ejemplo, agua, tampón, PBS, disolución de glucosa, disolución de sacarosa, disolución de manosa, preferiblemente una disolución equilibrada de sacarosa 5%, almidón, azúcar, gelatina o cualquier otro vehículo aceptable. Tales vehículos son conocidos por el experto en la técnica. Se reconocerá por el experto en la técnica que cualquiera de las realizaciones, usos y aspectos del medicamento o relacionado con el medicamento de la presente invención, es también aplicable a la composición farmacéutica de la presente invención y viceversa.

La indicación, enfermedades y trastornos para el tratamiento y/o prevención de los ácidos nucleicos, las composiciones farmacéuticas y los medicamentos de acuerdo con o preparados de acuerdo con la presente invención dan como resultado la implicación, bien directa o indirecta, de SDF-1 en el respectivo mecanismo patogénico.

Por supuesto, debido a que los ácidos nucleicos se unen a SDF-1 según la presente invención interacciona con o se une a SDF-1 humana o murina, un experto en la técnica entenderá normalmente que los ácidos nucleicos que se unen a SDF-1 según la presente invención se pueden emplear fácilmente para el tratamiento, prevención y/o diagnóstico de cualquier enfermedad como se describe en la presente memoria en seres humanos y animales. En relación con esto, se reconocerá que las moléculas de ácido nucleico según la presente invención se pueden emplear para el tratamiento y prevención de cualquiera de las enfermedades, trastornos o afecciones descritos en la presente memoria, independientemente del modo de acción subyacente de tal enfermedad, trastorno o afección.

A continuación se proporciona el uso racional de las moléculas de ácido nucleico según la presente invención junto con las distintas enfermedades, trastornos y afecciones, haciendo plausible, por tanto, la aplicación terapéutica, preventiva y diagnóstica reivindicadas de las moléculas de ácido nucleico según la presente invención. Para evitar cualquier repetición innecesaria, se deberá reconocer que debido a la implicación de SDF-1, el eje del receptor SDF-1 según se ha señalado junto a dicho eje se puede dirigir por las moléculas de ácido nucleico según la presente invención tal que se consiga el efecto terapéutico, preventivo y diagnóstico reivindicados. Se deberá reconocer además que las particularidades de las enfermedades, trastornos y afecciones, de los pacientes y cualquier detalle del régimen de tratamiento descritos en relación con esto, pueden ser objeto de realizaciones preferidas de la presente solicitud.

La mejora de células madre y/o células progenitoras en la sangre y más específicamente de sangre periférica es, entre otras cosas, útil en tratamientos para aliviar los efectos de protocolos que afectan de manera adversa a la médula ósea, tal como aquellos que dan como resultado leucopenia. Estos son efectos adversos conocidos de la quimioterapia y radioterapia. Los ácidos nucleicos de la presente invención mejoran también el éxito de trasplante de médula ósea, mejora la cicatrización de heridas, y ayuda en la recuperación del tejido de un órgano dañado. También combaten infecciones bacterianas que son prevalentes en leucemia. En la medida de lo posible, las moléculas de ácido nucleico de la presente invención se pueden emplear también para cualquier propósito y tratamiento y prevención, respectivamente, de cualquier enfermedad y condición.

Movilización de células madre para la regeneración de tejidos. En casos de daño de órganos, por ejemplo, debido al mal funcionamiento de la vasculatura o un trauma, la regeneración tisular es deseable pero no siempre se consigue. Las células madre de la médula ósea, preferiblemente células madre autólogas han mostrado tener beneficiosos para en una variedad de modelos animales de enfermedades y han probado ser beneficiosas en algunos casos en seres humanos.

Reparación de la retina y del epitelio del pigmento retiniano. Se han investigado células madre derivadas de la médula ósea en modelos de ratón de enfermedades vasculares retinianas y degenerativas. Estas células madre derivadas de la médula ósea muestran adhesión a los sitios dañados, para estabilizar la vasculatura anormal y para acelerar la neovascularización de áreas hipóxicas si se inyecta de manera intravítrea o subretiniana (Friedlander et al, 2007; Otani et al, 2002). Otros han encontrado que un subgrupo de células madre derivadas de la médula ósea se habían movilizadas con dianas G-CSF del epitelio del pigmento retiniano en los sitios dañados. Aparte de encontrarse que era necesaria la administración sistémica cultivada, la inyección intra-ocular de células madre no lo era. Por el contrario, la atracción al sitio del daño/lesión se consiguió mediante la sobre-expresión localizada transitoria de quimioquinas, por ejemplo, SDF-1 (Li et al, 2007; Li et al, 2006).

Reparación cardíaca. La acumulación de evidencias indica que el miocardio responde al crecimiento o al daño mediante el reclutamiento de células madre y/o progenitoras que participan en la reparación y en procesos regenerativos. En un modelo de infarto cardíaco de ratón, Fransioli et al., demostraron que células c-kit+, que son células madre, se acumulan 1-2 semanas después del infarto en el área infartada, lo más posiblemente para contribuir en la reparación de procesos (Fransioli et al, 2008). Dawn et al. informaron de la utilidad terapéutica potencial de células madre similares a las embrionarias muy pequeñas Sca-1/Lin-/CD45- derivadas de médula ósea (siglas VSELs). En un modelo de infarto de miocardio de ratón (siglas IM) el trasplante de un número relativamente pequeño de CD45-VSELs era suficiente para mejorar la función del ventrículo izquierdo y aliviar la hipertrofia de miocitos después del IM (Dawn et al., 2008).

Reparación y mejora de la inflamación después de un infarto isquémico. Schwarting et al., han investigado los efectos de células hematopoyéticas marcadas con péptido fluorescente verde Lin(-) mediante inyección en el tamaño del infarto, muerte celular apoptótica, inflamación post-isquémica y transcripción genética de citoquinas en un modelo de lesión cerebral isquémica de ratón. 24 horas después de la inyección, las células se encontraron en el bazo y después en el parénquima del cerebro isquémico, expresando células microgliales pero no proteínas marcadoras neuronales. El ensayo de daño tisular mostró volúmenes de infarto significativamente más pequeños y menos muerte celular neuronal apoptótica en áreas peri-infartadas en células madre hematopoyéticas-Lin(-) de los animales tratados. El análisis de la infiltración celular inmune en los hemisferios isquémicos reveló una reducción de las células T y de los macrófagos invasores en ratones tratados (Schwarting et al, 2008). Imitola et al., informaron anteriormente de que las células madre neuronales se unen a sitios dañados del sistema nervioso central (siglas SNC) a través de la ruta SDF-1 $\alpha$ /CXCR4.

A la luz de estos descubrimientos, la movilización de un número suficiente de células madre de la médula ósea es probablemente beneficioso para inducir procesos de reparación (Tang et al, 2007). Bloquear SDF-1 o su receptor CXCR4 es un planteamiento prometedor, ya que éste moviliza una variedad de células madre de la médula ósea. Se pueden determinar por un experto en la técnica que realiza la experimentación rutinaria dosis correctas, esquemas de dosificación y la localización potencial del agente movilizador, que se destinan preferiblemente a que las células madre se movilicen pero aún sean capaces de responder a señales quimiotácticas, para que se puedan recluir a sitios del daño tisular.

Debido a que las moléculas de ácido nucleico según la presente invención inhiben la señal entre SDF-1 y el receptor SDF-1, tal que las moléculas de ácido nucleico que se unen a SDF-1 se pueden emplear para la generación de un medicamento que puede ser para, movilización de células progenitoras y/o células madre a sangre periférica, y/o para el tratamiento de enfermedades y/o trastornos seleccionados preferiblemente del grupo que consiste en cicatrización de heridas; quemaduras; trastornos causados o asociados con daño de tejidos de órganos y/o vasculatura dañada, en las que tales trastornos se seleccionan de daño retiniano y corioideo, accidente cerebrovascular, daño de miocardio, infarto de miocardio, isquemia después del trasplante de órganos y de lesión traumática; y trastornos hematopoyéticos, en el que tales trastornos se seleccionan de anemia aplásica, leucemia, anemia inducida por fármacos y leucopenia, e infección bacteriana en leucopenia.

Para la movilización de células progenitoras y/o células madre el medicamento se puede usar en combinación con un segundo agente activo farmacéuticamente, en el que la función de dicho segundo agente activo farmacéuticamente es la movilización de células progenitoras y/o células madre. Los agentes movilizadores de células se seleccionan pero no se restringen al factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (siglas GM-CSF), interleuquina-8 (abreviado IL-8), proteína inflamatoria de macrófagos (siglas MIP), oncogen relacionado con el crecimiento, agentes que bloquean CXCR4 como AMD3001 (Aiuti, Webb et al., 1997) y factor estimulante de colonias de granulocitos (siglas G-CSF).

En caso de lesión del SNC, el empleo de un inhibidor de SDF-1 macromolecular para la movilización de células madre derivadas de médula ósea puede ser especialmente beneficioso. Aunque las células son aún sensibles a gradientes SDF-1, éstas están enmascaradas por el inhibidor de SDF-1 macromolecular en tejidos periféricos siempre y cuando se mantenga una concentración suficientemente alta en el cuerpo. Sin embargo, debido a que el inhibidor de SDF-1 macromolecular no puede cruzar la barrera hematoencefálica, los gradientes SDF-1 que originan la sobre-expresión de SDF-1 en los lugares del SNC con hipoxia o daño, persisten en el SNC y pueden atraer a algunas de las células movilizadas al lugar del daño donde pueden servir como se describió anteriormente. En una realización preferida, tal inhibidor de SDF-1 macromolecular es una molécula de ácido nucleico según la presente invención.

Combinación de SDF-1 bloqueado y quimioterapia. Aproximadamente el 20% de las leucemias linfoblásticas agudas del linaje B no se curan mediante quimioterapia tradicional. Estudios preclínicos que emplean células leucémicas ex vivo en co-cultivo con células estromales han proporcionado evidencia de que la interacción de blastos leucémicos con componentes de la médula ósea protege a las células leucémicas frente a la quimioterapia (Mudrey, Fortney et al., 2000; Garrido, Appelbaum et al., 2001; Tabe, Jin et al., 2007). Existen también informes sobre modelos animales en los que la inhibición de moléculas de la superficie celular que son importantes para la adhesión celular, y por tanto, que se dirigen a células hematopoyéticas (malignas), mejora la eficacia de la quimioterapia y conduce a la erradicación de células madre leucémicas (Matsunaga, Takemoto et al., 2003; Jin, Hope et al., 2006). SDF-1 se conoce por jugar un papel importante en dirigir y retener células madre en los huesos de la médula ósea. Existe una

5 acumulación preclínica y un informe de evidencia clínica de que el bloqueo de CXCR4, un receptor de SDF-1 en células hematopoyéticas, conduce también a la liberación de blastos de leucemia mieloide aguda de la médula ósea a sangre periférica, donde se pueden dirigir por quimioterapia (por ejemplo, mediante el agente citarabina) (Fierro, Brenner et al., 2008) u otros agentes que conducen a la muerte celular del tumor (por ejemplo biológicos en solitario o junto con anticuerpos que dependen de la citotoxicidad mediada por células o complemento dependiente de citotoxicidad). Adicionalmente Jin et al. han observado recientemente que el tratamiento de la leucemia mielógena crónica con inhibidores de tirosina quinasa (por ejemplo, imatinib) conduce a una regulación al alza de CXCR4 en células leucémicas. Esto da como resultado un incremento en el guiado a médula ósea e indujo un bloqueo del ciclo G0-G1 que hace a las células quiescentes e insensibles a otros planteamientos de quimioterapia (Jin, Tabe et al., 10 2008). A la luz de esto, la presente invención sugiere una terapia de combinación del agente quimioterapéutico junto con CXCR4 o un inhibidor de SDF-1 como las moléculas de ácido nucleico que se unen a SDF-1 según la presente invención, que incluyen pero no se limitan a NOX-A12-JE40, para disminuir el guiado de células leucémicas y movilizar células leucémicas quiescentes que se han dirigido a la médula ósea anteriormente. Debido a la pérdida de señales las células pueden progresar a través del ciclo celular y son, por tanto, más sensibles a la quimioterapia. La quimioterapia así como los respectivos agentes empleados se conocen en la técnica, por ejemplo, anticuerpos tales como Rituximab, Ibritumomab tiuxetan, Tositumomab; agentes alquilantes tales como cisplatino y carboplatino, así como oxaliplatino, mecloretamina; ciclofosfamida, clorambucilo; anti-metabolitos tales como purineazatioprina, mercaptopurina; alcaloides y terpenos vegetales tales como alcaloides de la vinca y taxanos; podofilotoxina; eotilona; e inhibidores de topoisomerasas tales como campotecinas.

20 Por lo tanto, el medicamento como se describe en la presente memoria se puede emplear para la movilización de células cancerosas en la sangre periférica del sujeto, en el que las células cancerosas se seleccionan pero no se restringen al grupo de células leucémicas, células de mieloma, células de linfoma, células madre cancerosas, células cancerosas con potencia metastásica y metástasis cancerosas.

25 El medicamento según la presente invención se puede emplear en combinación con un segundo medicamento o un segundo agente activo farmacéuticamente que se puede emplear para la movilización de células cancerosas en la sangre periférica del sujeto. El segundo agente activo farmacéuticamente comprende agentes que movilizan células como se describe en la presente memoria anteriormente.

30 Además, el medicamento según la presente invención se puede emplear en combinación con un tercer medicamento o un tercer agente activo farmacéuticamente, en el que el tercer agente activo daña, destruye y/o marca a la células o células cancerosas. Tales medicamentos que destruyen células cancerosas se seleccionan preferiblemente pero no se restringe al grupo de anticuerpos tales como Rituximab, Ibritumomab tiuxetan, Tositumomab; agentes alquilantes tales como cisplatino y carboplatino, así como oxaliplatino, mecloretamina; ciclofosfamida, clorambucilo; anti-metabolitos tales como purineazatioprina, mercaptopurina; alcaloides y terpenos vegetales tales como alcaloides de la vinca y taxanos; podofilotoxina; eotilona; e inhibidores de topoisomerasas tales como campotecinas.

35 El tercer medicamento o agente activo farmacéuticamente tiene o puede proporcionar la función de una quimioterapia.

40 Los medicamentos que marcan las células cancerosas conducen a una activación de una defensa del cuerpo que se dirige a la célula cancerosa marcada, en el que el medicamento se selecciona pero no se restringe al grupo de anticuerpos monoclonales. Funcionan mediante antígenos específicos de tumores diana, por lo tanto, mejoran la respuesta inmune del hospedador para células tumorales a las que se une el agente. Ejemplos son trastuzumab (marca comercial Herceptin), cetuximab, y rituximab (marcas comerciales: Rituxan o Mabthera).

La terapia de combinación del medicamento según la presente invención se puede realizar con el segundo y/o el tercer medicamento.

45 El sujeto que se trata con el medicamento de movilización de las células cancerosas se puede someter posterior o simultáneamente a radioterapia. En una realización la radioterapia se puede emplear como un tratamiento alternativo para el tercer agente activo farmacéuticamente, y con o sin radioterapia, se puede emplear para el tratamiento y/o prevención del cáncer, preferiblemente de tumores sólidos y neoplasias hematológicas, más preferiblemente leucemia, linfoma, y mieloma en el que preferiblemente el medicamento según la presente invención se usa en combinación con el tercer medicamento o radioterapia.

Movilización de células plasmáticas de vida larga, células B y células T de memoria en enfermedades autoinmunes

55 Las células B, y/o células T de memoria retornan desde el cuerpo hasta la médula ósea y posiblemente a otros lugares, por ejemplo, nódulos linfáticos, y/o se desarrollan por el gradiente de SDF-1 que se forma por la expresión de SDF-1 en las células estromales (Parretta, Cassese et al., 2005; Zhang, Nakajima et al., 2005; Radbruch, Muehlinghaus et al., 2006). En los huecos, estas células están en un estado durmiente en el que no son sensibles a fármacos que modifican la enfermedad (por ejemplo, fármacos citostáticos o metotrexato) que se emplean normalmente para el tratamiento de enfermedades autoinmunes. Una vez ellas abandonan los huecos, se pueden dividir fácilmente y comenzar a reanudar una nueva respuesta si encuentran un antígeno análogo que conduce

probablemente a perpetuar la enfermedad autoinmune. Interferir con el gradiente de SDF-1 en la médula ósea y con otros huecos mediante ácidos nucleicos que se unen a SDF-1 o al bloqueo de CXCR4 puede conducir a la movilización de células B y/o células T y permite su reducción desde la sangre a través de aféresis o dirigiéndolos con un medicamento adecuado.

5 Después de la producción de un anticuerpo activo con una respuesta inmunológica aguda mediante células B diferenciadas terminales (células plasmáticas) la mayoría de estas células se mueren con la resolución de la inflamación o la eliminación del antígeno extraño (por ejemplo, proteína vírica). Existe, sin embargo, una minoría de células B de memoria que puede retornar a plasmoblastos con la ayuda de una células T. Estos plasmoblastos tienen la capacidad de migrar en respuesta a estímulos quimiotácticos en lugares donde sobreviven durante años como  
 10 células plasmáticas de "memoria" de vida prolongada. Durante la transición, las células pierden la expresión de CXCR5 y CCR7 y no migran más extensamente hacia los respectivos ligandos. Sin embargo, la expresión de CXCR4 se mantiene. Por tanto, las células se moverán hacia los sitios de expresión de SDF-1, donde se pueden encontrar con señales que sobreviven a largo plazo, que pueden ser distintas o complementarias a SDF-1 (Minges Wols et al, 2007). Estos espacios pueden estar tanto en médula ósea como en la periferia, por ejemplo, en tejidos inflamados. Las células plasmáticas de vida larga son probablemente las más responsables del mantenimiento de los títulos plasmáticos protectores que a menudo se mantienen durante años tras una infección o una vacunación (Tarlinton et al., 2008). Las células plasmáticas de vida larga no son susceptibles a fármacos que modifican enfermedades como otras células B y T, lo más probablemente debido a que no se dividen. Además, no pueden ser guiadas por el tratamiento del anticuerpo anti-CD20, ya que las células plasmáticas no tienen CD20. En  
 20 enfermedades autoinmunes que se mantienen por anticuerpos secretados por células plasmáticas y células plasmáticas de vida larga, podría ser beneficioso eliminar estas células, para que el sistema inmune parara de atacar al propio tejido. Un método para reducir las células plasmáticas de la sangre del paciente se puede realizar mediante aféresis, por ejemplo, empleando anticuerpo anti CD138 (sindecano-1) sobre una matriz de afinidad (por ejemplo, una columna o perlas) (Minges Wols y Witte, 2008; Wijdenes et al, 1996). Para eliminar no sólo las células plasmáticas circulantes sino también las células plasmáticas de vida larga residentes sería favorable movilizar las  
 25 últimas de sus huecos. Esto se podría realizar mediante la administración sistémica de una molécula de ácido nucleico según la presente invención que destruyese los gradientes de SDF-1 y movilizase estas células que se mueven hacia SDF-1 en la sangre periférica.

30 Por lo tanto, el medicamento según la presente invención se puede emplear para la movilización de células plasmáticas de vida larga, células B y/o células T en la sangre periférica de un sujeto.

El medicamento según la presente invención se puede emplear en combinación con un segundo medicamento o segundo agente activo farmacéuticamente que se puede emplear para la movilización de células plasmáticas de vida larga, células B y/o células T en la sangre periférica de un sujeto. El segundo medicamento o agente activo farmacéuticamente comprende un agente movilizador de células como se describe en la presente memoria anteriormente pero no se restringe a los mismos.

35 Aunque las células se movilizan por un medicamento según la presente invención en solitario o en combinación con un segundo medicamento o agente activo farmacéuticamente como se describe anteriormente, se pueden aclarar la sangre mediante aféresis, clasificación celular y/o citometría de flujo (por ejemplo, clasificación de células activadas por fluorescencia [FACS] y/o clasificación celular activada magnéticamente [MACS] con células plasmáticas de vida  
 40 larga, células B o marcadores de superficie de células T).

Por otra parte, el medicamento según la presente invención se puede emplear en combinación con un tercer medicamento o un tercer agente activo farmacéuticamente, en el que el tercer medicamento o tercer agente activo farmacéuticamente daña, destruye y/o marca las células plasmáticas de vida larga, células B y/o células T en la sangre periférica. Tales medicamentos destruyen las células plasmáticas de vida larga, células B y/o células T que se seleccionan pero no se restringen a fármacos que modifican enfermedades, por ejemplo, metotrexato o agentes citotóxicos. Ejemplos de medicamentos que marcan las células plasmáticas de vida larga, células B y/o células T que conducen a una activación de las defensas del cuerpo dirigida a las células plasmáticas de vida larga, células B y/o células T marcadas de las mismas incluyen, pero no se limitan a, las seleccionadas del grupo que consiste en rituximab, anticuerpos que se unen al receptor IL-6 o anticuerpos que se unen a sindecano-1.

50 La terapia de combinación del medicamento según la presente invención se puede realizar con el segundo o el tercer medicamento.

El sujeto que se trata de acuerdo con la presente invención con el medicamento según la presente invención para la movilización de las células plasmáticas de vida larga, células B y/o células T se pueden someter posterior o simultáneamente con radioterapia, que daña o destruye las células del sistema inmune del paciente que se dividen,  
 55 que finalmente se ataca así mismo. La radioterapia se puede emplear como tratamiento alternativo para el tercer medicamento. El empleo del medicamento según la presente invención, en combinación o no del segundo medicamento o segundo agente activo farmacéuticamente, con o sin el tercer medicamento o el tercer agente activo farmacéuticamente, se puede emplear para el tratamiento y/o prevención de enfermedades autoinmunes, movilización de células plasmáticas de vida larga, células B y/o células T en solitario o junto con un concepto

terapéutico más complejo puede ser beneficioso para el tratamiento de varias enfermedades que incluyen pero no se limitan a

- 5 enfermedades autoinmunes sistémicas en las que tal enfermedad autoinmune sistémica se selecciona preferiblemente de alergia, anemia hemolítica autoinmune de tipo caliente o fría, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, shock hemorrágico, diabetes de tipo 1, escleroderma difusa, policondritis, síndrome autoinmune poliglandular, lupus eritematoso sistémico y manifestaciones del mismo, artritis reumatoide, enfermedad reumática en el ojo, cerebro, pulmón, riñones, corazón, hígado, tracto gastrointestinal, bazo, piel, huesos, sistema linfático, sangre y otros órganos;
- 10 enfermedades autoinmunes del tracto gastrointestinal en las que tal enfermedad autoinmune del tracto gastrointestinal se selecciona preferiblemente de enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad celíaca, intolerancia al gluten, enfermedad intestinal inflamatoria, pancreatitis, esofagitis eosinofílica;
- enfermedades autoinmunes cutáneas en las que tal enfermedad autoinmune cutánea se selecciona preferiblemente de psoriasis, urticaria, dermatomiositis, pénfigo vulgar, pénfigo foliáceo, pénfigoide bulloso, escleroderma morfea/lineal, vitiligo, dermatitis herpetiforme o enfermedad de Dühring, líquen escleroso;
- 15 enfermedades autoinmunes de la vasculatura en la que tal enfermedad autoinmune de la vasculatura se seleccionan preferiblemente de vasculitis, preferiblemente arteritis de la temporal, vasculitis, derrame vascular, polimialgia reumática, aterosclerosis, síndrome de Churg-Strauss, arteritis Takayasu, síndrome Goodpasture, preferiblemente que afecte sobre todo a los riñones, más específicamente los glomérulos, y/o que afecte también a los pulmones, glomerulonefritis, poliarteritis nodosa, enfermedad de Behcet;
- 20 enfermedades autoinmunes del sistema nervioso en la que tal enfermedad autoinmune del sistema nervioso se selecciona preferiblemente de esclerosis múltiple, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, disfunción neurocognitiva, síndrome de la persona rígida (stiffman), síndrome de Guillain-Barré, miastenia gravis, síndrome de Lambert-Eaton;
- 25 enfermedades autoinmunes de los músculos esqueléticos en la que tal enfermedad autoinmune de los músculos esqueléticos se selecciona preferiblemente de espondilitis anquilosante, sarcoidosis, polimialgia reumática, polimiositis, artritis psoriásica, fiebre reumática, policondritis, fibromialgia, artritis reumatoide juvenil, enfermedad de Lyme, artritis reactiva, espondiloartropatía, enfermedad articular degenerativa;
- 30 y otras enfermedades autoinmunes en la que tales otras enfermedades autoinmunes se seleccionan preferiblemente del síndrome de Cogan, adrenalitis autoinmune, enfermedad de Ménière, inflamaciones locales, alopecia areata, enfermedades inflamatorias agudas, cirrosis biliar primaria, síndrome de Sjörgen, escleroderma tal como escleroderma difusa, síndrome CREST y/o escleroderma morfea/lineal, uveítis autoinmune, tiroiditis Hashimoto, enfermedad de Graves, hepatitis autoinmune, glomerulonefritis, síndrome anti-fosfolípidos, fibrosis pulmonar idiopática, infertilidad autoinmune, trastornos complejos autoinmunes y peritonitis.
- 35 Por otra parte, el empleo del medicamento según la presente invención, en combinación con o sin el segundo medicamento o segundo agente activo farmacéuticamente, se puede emplear para el tratamiento y/o prevención de la enfermedad de injerto contra huésped después del trasplante de médula ósea o rechazo a trasplantes de órganos trasplantados que se seleccionan preferiblemente de hígado, riñón, intestino, pulmón, corazón, piel, extremidades, córnea, islotes de Langerhans, médula ósea, vasos sanguíneos y páncreas.
- 40 En un modelo de ratón de enfermedad alérgica de vías aéreas, un anticuerpo que se dirige a CXCR4 en leucocitos reduce la hiper capacidad de respuesta y la eosinofilia pulmonar, indicando que las señales mediadas por CXCR4 contribuye a la inflamación pulmonar (Gonzalo, Lloyd et al., 2000). Existe evidencia de que SDF-1 contribuye a la angiogénesis. Evidencias clínicas y experimentales indican que los leucocitos que se infiltran en la piel juegan un papel crucial en la iniciación y el mantenimiento de la dermatitis atópica y se ha demostrado que SDF-1 es un factor importante para el reclutamiento de linfocitos T y células dendríticas, (Gombert, Dieu-Nosjean et al., 2005). Debido a
- 45 que los leucocitos y especialmente las células T expresan el receptor de SDF-1, CXCR4, y responden quimiotácticamente a gradientes de SDF-1, la alteración de estos gradientes mediante la unión a SDF-1 y neutralización del ácido nucleico según la presente invención es adecuada para ayudar en enfermedades inflamatorias con exceso de inflamación con o sin un origen bacteriano o viral, inflamación del pulmón y/o de la piel, preferiblemente psoriasis.
- 50 La artritis reumatoide es una enfermedad autoinmune sistémica potencial que normalmente comienza en las pequeñas articulaciones de manos y pies. Su característica es la inflamación de la membrana sinovial que se caracteriza por infiltración de la membrana y del tejido circundante por leucocitos, especialmente macrófagos, células T y células B. Este proceso y la secreción de proteasas y citoquinas pro-inflamatorias, conduce al engrosamiento de la membrana sinovial y al crecimiento del tejido esponjoso, llamado pannus. Éste prolifera
- 55 alrededor de la articulación e invasivamente en el hueso y cartílago, conduciendo a su destrucción irreversible. El pannus desencadena la formación de neovasculatura para su propio riego sanguíneo. Iwamoto et al., han encontrado recientemente que un número de citoquinas están elevadas en el tejido sinovial y el fluido sinovial de pacientes con AR, entre ellos está SDF-1 (Iwamoto et al, 2008). La regulación al alza de SDF-1 se ha demostrado

también previamente in vitro mediante la adición de fluido sinovial en pacientes con AR a sinoviocitos similares a fibroblastos cultivados. Este fluido o la adición de IL-17 induce la expresión de ARNm de SDF-1 por los sinoviocitos. La inducción de la expresión de SDF-1 se podría anular mediante adición de anticuerpos anti-IL17 (Kim et al, 2007). En el contexto de una articulación inflamada, SDF-1 puede actuar de una manera triple. Primero como un quimioatrayente para leucocitos, segundo como un atrayente para células progenitoras endoteliales que se necesitan para la angiogénesis o tercero como un desencadenante de la expresión del factor de crecimiento descendente, tal como VEGF, que conduce después al crecimiento de la neovascularización.

En base a estos experimentos, los inventores asumen que un medicamento que se emplea para la inhibición de la migración de leucocitos, preferiblemente desde la sangre periférica hasta un tejido, puede permitir el tratamiento y/o prevención de enfermedades y/o trastornos como sigue.

La migración de leucocitos se puede iniciar mediante antígenos no autónomos de órganos trasplantados, en los que los órganos trasplantados se seleccionan del hígado, riñón, intestino, pulmón, corazón, piel, extremidades, córnea, islotes de Langerhans, médula ósea, vasos sanguíneos y páncreas. Por lo tanto, un medicamento que conduce a una inhibición de la migración de leucocitos se puede emplear para la prevención y/o tratamiento del rechazo a trasplantes de órganos trasplantados como se describe en la presente memoria.

Por otra parte, la migración de leucocitos se puede iniciar mediante inflamación que aparece o se asocia con

enfermedades autoinmunes sistémicas en las que tal enfermedad autoinmune sistémica se selecciona preferiblemente de alergia, anemia hemolítica autoinmune de tipo caliente o fría, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, shock hemorrágico, diabetes de tipo 1, escleroderma difusa, policondritis, síndrome autoinmune poliglandular, lupus eritematoso sistémico y manifestaciones del mismo, artritis reumatoide, enfermedad reumática en el ojo, cerebro, pulmón, riñones, corazón, hígado, tracto gastrointestinal, bazo, piel, huesos, sistema linfático, sangre y otros órganos;

enfermedades autoinmunes del tracto gastrointestinal en las que tal enfermedad autoinmune del tracto gastrointestinal se selecciona preferiblemente de enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad celíaca, intolerancia al gluten, enfermedad intestinal inflamatoria, pancreatitis, esofagitis eosinofílica;

enfermedades autoinmunes cutáneas en las que tal enfermedad autoinmune cutánea se selecciona preferiblemente de psoriasis, urticaria, dermatomiositis, pénfigo vulgar, pénfigo foliáceo, penfigoide bulloso, escleroderma morfea/lineal, vitiligo, dermatitis herpetiforme o enfermedad de Dühring, líquen escleroso;

enfermedades autoinmunes de la vasculatura en la que tal enfermedad autoinmune de la vasculatura se seleccionan preferiblemente de vasculitis, preferiblemente arteritis de la temporal, vasculitis, derrame vascular, polimialgia reumática, aterosclerosis, síndrome de Churg-Strauss, arteritis Takayasu, síndrome Goodpasture, preferiblemente que afecte sobre todo a los riñones, más específicamente los glomérulos, y/o que afecte también a los pulmones, glomerulonefritis, poliarteritis nodosa, enfermedad de Behcet;

enfermedades autoinmunes del sistema nervioso en la que tal enfermedad autoinmune del sistema nervioso se seleccionan preferiblemente de esclerosis múltiple, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, disfunción neurocognitiva, síndrome de la persona rígida (stiffman), síndrome de Guillain-Barré, miastenia gravis, síndrome de Lambert-Eaton;

enfermedades autoinmunes de los músculos esqueléticos en la que tal enfermedad autoinmune de los músculos esqueléticos se selecciona preferiblemente de espondilitis anquilosante, sarcoidosis, polimialgia reumática, polimiositis, artritis psoriásica, fiebre reumática, policondritis, fibromialgia, artritis reumatoide juvenil, enfermedad de Lyme, artritis reactiva, espondiloartropatía, enfermedad articular degenerativa;

y otras enfermedades autoinmunes en la que tales otras enfermedades autoinmunes se seleccionan preferiblemente del síndrome de Cogan, adrenalitis autoinmune, enfermedad de Ménière, inflamaciones locales, alopecia areata, enfermedades inflamatorias agudas, cirrosis biliar primaria, síndrome de Sjörgen, escleroderma tal como escleroderma difusa, síndrome CREST y/o escleroderma morfea/lineal, uveítis autoinmune, tiroiditis Hashimoto, enfermedad de Graves, hepatitis autoinmune, glomerulonefritis, síndrome anti-fosfolípidos, fibrosis pulmonar idiopática, infertilidad autoinmune, trastornos complejos autoinmunes y peritonitis.

Por otra parte, un medicamento que conduce a una inhibición o reducción de la migración de leucocitos se puede emplear para la prevención y/o tratamiento de la inflamación que aparece o asocia con la enfermedad autoinmune como se describe en la presente memoria.

Como se muestra en el modelo de ratón de enfermedad alérgica de vías aéreas, el medicamento que conduce a una inhibición de la migración de leucocitos puede ser eficaz en el tratamiento y/o prevención de reacciones alérgicas de la piel y/o la mucosa de vías aéreas, preferiblemente fiebre del heno, asma, hiper capacidad de respuesta de las vías aéreas y/o dermatitis, preferiblemente dermatitis de contacto y/o dermatitis atópica.

La movilización de células progenitoras y/o células madre por el ácido nucleico según la presente invención proporciona un método para obtener estas células a partir de un sujeto. De ese modo, una cantidad eficaz de las moléculas de ácido nucleico según la invención se administra a un sujeto, conduciendo a la movilización de células progenitoras y/o células madre en la sangre periférica del sujeto. Las células se pueden cultivar a partir de un sujeto, desde la sangre periférica del sujeto respectivamente, mediante aféresis, leucaféresis, clasificación de células y/o citometría de flujo como se describe en la presente memoria.

Después de cultivar las células progenitoras y/o las células madre del sujeto, el sujeto, preferiblemente un primer sujeto, se puede someter posterior o simultáneamente a quimioterapia o radioterapia.

La quimioterapia y la radiación afectan normalmente a las células que se dividen rápidamente. Se emplean para tratar el cáncer ya que las células cancerosas se dividen más frecuentemente que las células sanas. Sin embargo, debido a que las células de la médula ósea se dividen también de manera frecuente, los tratamientos a dosis altas pueden dañar o destruir gravemente la médula ósea del paciente. Sin una médula ósea sana, el paciente no es capaz de producir las células sanguíneas necesarias para transportar oxígeno, que luchan contra la infección, y previenen frente al sangrado. Las células madre sanguíneas periféricas que se trasplantan reemplazan a las células madre que se destruyeron por el tratamiento. La salud de las células madre trasplantadas puede restablecer la capacidad de la médula ósea para producir células sanguíneas que el paciente necesita.

El trasplante de células madre sanguíneas periféricas se emplean normalmente en el tratamiento de la leucemia y el linfoma. Es más eficaz cuando la leucemia o el linfoma está en remisión (los signos y síntomas del cáncer han desaparecido). El trasplante de células madre de sangre periférica se emplea también para tratar otros cánceres como el neuroblastoma (cáncer que presenta células nerviosas inmaduras y afecta a bebés y niños) y mieloma múltiple. Los investigadores están evaluando el trasplante de células madre sanguíneas periféricas en ensayos clínicos (estudios de investigación) para el tratamiento de varios tipos de cánceres (NCI, 2001).

Como se muestra en la Fig. 41 y 43 se pueden tratar varios tipos de cánceres como la leucemia y los tumores sólidos, trastornos linfoproliferativos y trastornos no cancerosos tales como enfermedades autoinmunes, trastornos hematopoyéticos mediante el trasplante de células madre hematopoyéticas alogénicas y/o autólogas (abreviado HSCT) (Gratwohl, Baldomero et al 2002).

Si la quimioterapia o radioterapia se realiza posteriormente en el primer sujeto preferiblemente, en el que la quimioterapia o la radioterapia se realiza o administra para dañar o destruir las células del tumor, las células progenitoras y/o células madre cultivadas del primer sujeto preferiblemente, se puede administrar en la sangre periférica de la columna vertebral del primer sujeto preferiblemente. De manera alternativa, un segundo sujeto puede aportar sus células progenitoras y/o células madre cultivadas al primer sujeto, que tiene un nivel bajo de células progenitoras y/o células madre o estas células progenitoras y/o células madre se han destruido antes, por ejemplo, mediante quimioterapia o radioterapia.

El método se puede emplear para el tratamiento del cáncer, preferiblemente tumores sólidos, tumores hematológicos o neoplasias.

En las enfermedades autoinmunes se incluyen pero se limitan a, por ejemplo, lupus eritematoso, artritis reumatoide, especialmente en casos graves, una de las opciones terapéuticas es la de realizar un tratamiento mieloablativo o más selectivamente un régimen terapéutico linfoblástico y recuperar a partir de entonces el sistema hematopoyético del paciente (Burt, Marmont et al., 2006). Las células madre hematopoyéticas y las células progenitoras hematopoyéticas que necesitan del injerto del sistema hematopoyético se movilizan eficazmente por las moléculas de ácido nucleico según la presente invención que incluyen pero no se limitan al Spiegelmer NOX-A12-JE40 de unión a SDF-1, o mediante otra estrategia de bloquear SDF-1 o su receptor CXCR4 respectivo.

Alternativamente las células progenitoras/células madre hematopoyéticas se cultivan a partir de la sangre y se emplean para reconstituir el sistema inmune del paciente después de la ablación del sistema hematopoyético que incluye los linfocitos auto-reactivos por terapia de quimioterapia y/o radioterapia. Esto, en principio, constituye una terapia curativa para enfermedades autoinmunes.

La movilización de células plasmáticas de vida larga, células B y/o células T mediante el ácido nucleico según la presente invención proporciona un método para reducir estas células de un sujeto. De esta manera una cantidad eficaz de la molécula de ácido nucleico según la invención se administra a un sujeto, conduciendo a la movilización de células plasmáticas de vida larga, células B y/o células T en la sangre periférica del sujeto. Las células T cultivadas son células T de memoria preferiblemente. Las células se pueden extraer del sujeto, a partir de la sangre periférica del sujeto respectivamente, mediante aféresis, leucaféresis, clasificación celular y/o citometría de flujo como se describe en la presente memoria. La extracción se realiza preferiblemente mediante citometría de flujo con marcadores de superficie adecuados para dichas células.

El método para cultivar células progenitoras y/o células plasmáticas de vida larga, células B y/o células T respectivamente se puede emplear para el tratamiento y/o prevención de enfermedades autoinmunes sistémicas, enfermedades autoinmunes del tracto gastrointestinal, enfermedades autoinmunes cutáneas, enfermedades

autoinmunes de la vasculatura, enfermedades autoinmunes del sistema nervioso, enfermedades autoinmunes musculoesqueléticas y otras enfermedades autoinmunes como se describen en la presente memoria.

La nefropatía diabética (abreviado ND) es una causa importante de la fase final de enfermedad renal. Aunque los inhibidores de angiotensina pueden prevenir la progresión de la enfermedad en muchos casos, no hay una terapia viable para los que no responden. En ND el penacho glomerular se somete a un remodelado estructural lento pero progresivo caracterizado por hipertrofia glomerular, acumulación nodular y difusa de matriz mesangial extracelular, y daño de podocitos. Lo último se cree que causa la progresión de la microalbuminuria en etapas tempranas hasta una clara proteinuria y glomeruloesclerosis en las etapas tardías de la ND. El inicio y la progresión de la ND implica numerosos patomecanismos que incluyen el depósito de productos finales de la glicosilación avanzada, disfunción endotelial, expresión local aumentada de factores de crecimiento y mediadores proinflamatorios. Generalmente, las quimioquinas pertenecen al último grupo de factores porque determinadas quimioquinas promueven la inflamación mediante el reclutamiento y la activación de células inmunes en ND similares a otros tipos de enfermedades renales. Por ejemplo, la delección dirigida o el bloque terapéutico de la proteína quimioatrayente de monocitos MCP-1/CCL2 puede prevenir la glomeruloesclerosis mediante el bloqueo del reclutamiento de macrófagos en glomérulos de ratones con diabetes tipo 1 o tipo 2 (T1D/T2D) (Chow et al, 2007; Chow et al., 2006; Kulkarni et al, 2007).

No se conoce nada acerca de SDF-1 en ND. La ND carece bien de proliferación o bien de autoinmunidad de los podocitos, por tanto, los estudios anteriormente mencionados casi no predicen el papel funcional predominante de SDF-1 en ND. Sin embargo, los inventores tienen razones para asumir que el remodelado progresivo de la estructura glomerular hacia la glomeruloesclerosis, una variante morfológica de la cicatrización de heridas, podría implicar la señalización de SDF-1. En base a los datos disponibles de otras enfermedades no parece claro si SDF-1 protege de forma predominante de la DN, por ejemplo, mediante el mantenimiento de la integridad del tejido y apoyando la regeneración, o si SDF-1 promueve predominantemente la ND, por ejemplo, mediante la mejora de la glomeruloesclerosis. Los datos de los inventores empleando el ácido nucleico NOX-A12-JE40 (SEQ ID NO: 132) de unión a SDF-1 como una molécula representativa de las moléculas de ácido nucleico según la presente invención, en un modelo de ratón de nefropatía diabética apoya esto último, lo que identifica un nuevo patomecanismo de glomeruloesclerosis, y SDF-1 como una diana terapéutica potencial en ND en el Ejemplo 12. Por lo tanto, NOX-A12-JE40 (SEQ ID NO: 132) puede ser útil como terapia para el tratamiento o prevención de la nefropatía diabética. El mecanismo de acción puede mediar también potencialmente mediante la movilización de células progenitoras y/o células madre derivadas de la médula ósea (Ito et al., 2001). Por lo tanto, los ácidos nucleicos SDF-1 descritos en la presente memoria se pueden emplear para la fabricación de un medicamento, en el que el medicamento es para el tratamiento y/o prevención de la nefropatía y preferiblemente de la nefropatía diabética.

#### Hipertensión arterial pulmonar

La hipertensión arterial pulmonar (abreviada HP) es una enfermedad grave de etiología escasamente conocida caracterizada por presión arterial pulmonar elevada, que conduce a un fallo cardíaco del lado derecho, y finalmente la muerte. La HP es el resultado de un engrosamiento de las arterias pulmonares pequeñas que dan como resultado, al menos, en parte, una disfunción y proliferación de las células del músculo endotelial y liso. La proliferación de células endoteliales vasculares aumentadas y la muscularización de la vasculatura son características patológicas de remodelado vascular pulmonar, y se ha demostrado que este proceso se asocia con la producción de factores angiogénicos, mediadores inflamatorios, y vasoconstrictores que inducen a hipoxia. Yamaji-Kegan et al., encontraron en un estudio de cultivo de órganos de pulmón de ratón ex vivo que CXCL12/SDF-1 se regulaba al alza y podía estar implicado en el reclutamiento intrapulmonar de células circulantes mediante la sobre-expresión del factor mitogénico que induce hipoxia (abreviado HIMF) (Yamaji-Kegan, Su et al., 2006). Se ha descrito también la influencia de SDF-1 en el remodelado vascular en la hipertensión general y en la arterial pulmonar (Schober y Zerneck 2007). Por tanto, el bloqueo de SDF-1 mediante los ácidos nucleicos que se unen a SDF-1 como se describe en la presente memoria se puede emplear en el tratamiento y/o prevención de la hipertensión, preferiblemente la hipertensión pulmonar, más específicamente la hipertensión arterial pulmonar.

#### Fibrosis pulmonar idiopática

El tejido pulmonar de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática se describe por tener altas cantidades de células que expresan tanto SDF-1 como CXCR4 en comparación con los pulmones normales. En un modelo de ratón de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina, Xu et al., generaron datos que muestran que la administración del antagonista de CXCR4 (TN14003) atenúa significativamente la fibrosis pulmonar (Xu, Mora et al., 2007). Por lo tanto, el bloqueo de SDF-1 mediante ácidos nucleicos que se unen a SDF-1 como se describe se pueden emplear para el tratamiento y/o prevención de la fibrosis pulmonar idiopática.

#### Fibrosis en cicatrización de heridas

Después de la lesión mediante quemadura de la piel de rata, cerdo y seres humanos, se ha demostrado que se sobre-expresa SDF-1. Aunque es beneficioso durante un período de tiempo corto después de la lesión, se cree que promueve la atracción de leucocitos (por ejemplo, eosinófilos) y fibrosis en lugar de promover la epitelización (Avniel, Arik et al., 2006). Mediante la inhibición de CXCR4 o SDF-1 por ácidos nucleicos que se unen a SDF-1 como se describe en la presente memoria, se puede obtener la cicatrización de heridas con menos fibrosis.

Como se describe anteriormente, SDF-1 ha demostrado que está implicado en dirigir las células endoteliales hacia el coroides durante la neovascularización en tejido ocular, en el que el papel exacto de estas células está aún en investigación (Sengupta, Caballero et al., 2005). Sin embargo, los inventores podrían mostrar en dos modelos de animal independientes que el bloqueo de SDF-1 mediante ácido nucleico de unión a SDF-1 según la presente invención como se describe en la presente memoria conduce a una reducción de la neovascularización.

El modelo animal de 'neovascularización coroidea inducida por láser' se emplea para predecir el efecto de fármacos en investigación sobre la neovascularización coroidea y retiniana humana. Esto ocurre en enfermedades como la degeneración macular húmeda o 'proliferativa' relacionada con la edad (abreviada DMRE), retinopatía diabética y oclusión de la vena retiniana. Se ha demostrado que CXCR4 se expresa en CNV inducida por láser (Lima et al., FASEB J. 21; 2007). Ésta se colocaliza con CD45 y F4/80 que expresa células que sugieren que estas células son macrófagos derivados de BM. Los inhibidores de CXCR4 reducen la CNV inducida por láser. Pero no se investigó si las células CXCR4 expresan SDF-1, también. Como se muestra con éxito en el Ejemplo 11 en la presente memoria, el ácido nucleico NOX-A12-JE40 (SEQ ID NO: 132) de unión a SDF-1 como una molécula de ácido nucleico representativa según la presente invención, bloquea la neovascularización en un modelo animal de CNV.

El modelo murino de retinopatía inducida por oxígeno es un modelo para la imitación de la neovascularización de la retina inducida por hipoxia, como se observa en RD y en DMRE, especialmente en RD y DMRE proliferativa (Smith, Wesolowski et al., 1994). El modelo se refiere también como una retinopatía prematura ya que los bebés prematuros que se pusieron en incubadoras en hospitales se volvieron ciegos debido a una exposición a oxígeno demasiado alta en las incubadoras que condujo a un crecimiento anormal de los vasos retinianos durante el tiempo en la incubadora y que después volvieron a condiciones normóxicas. Como se describe en el Ejemplo 14, en el modelo de ratón el ácido nucleico NOX-A12-JE40 (SEQ ID NO: 132) de unión a SDF-1 como una molécula de ácido nucleico representativa según la presente invención inhibe significativamente la formación del penacho y, por tanto, mejora la puntuación de retinopatía general como se observa en el día P17 como se describe en la presente memoria.

Por otra parte, como se muestra en el Ejemplo 9, en un ensayo de cultivo de órgano de angiogénesis estándar, un ensayo de germinación de anillo aórtico, el ácido nucleico 193-G2-012-5'-PEG (NOX-A12-JE40 (SEQ ID NO: 132) de unión a SDF-1 como una molécula de ácido nucleico representativa según la presente invención bloquea SDF-1 que induce la aparición de SDF-1.

Por tanto, los ácidos nucleicos que se unen a SDF-1 como se describen en la presente memoria se pueden emplear para fabricación de un medicamento, en el que el medicamento es para el tratamiento de enfermedades y/o trastornos que implican angiogénesis y/o neovascularización, preferiblemente neovascularización coroidea. El modelo animal para neovascularización ha demostrado, que los ácidos nucleicos que se unen a SDF-1 como se describe en la presente memoria, se pueden emplear como un medicamento para el tratamiento de enfermedades y/o trastornos que se seleccionan del grupo que comprende enfermedades de la retina, preferiblemente degeneración relacionada con la edad, retinopatía diabética, oclusión de la vena retiniana, edema macular y edema retiniano.

La neovascularización se define preferiblemente en la presente memoria como la formación de redes microvasculares funcionales con perfusión de células sanguíneas rojas. La neovascularización difiere de la angiogénesis en que la angiogénesis se caracteriza principalmente por la protrusión y la extensión de nuevos capilares y la formación de vasos sanguíneos pre-existentes.

Inhibición del edema vascular retiniano

En el trascurso de la degeneración macular relacionada a la edad (DMRE), la retinopatía diabética y las oclusiones de la vasculatura retiniana, se observa a menudo la formación de un edema macular. Generalmente, un incremento de la permeabilidad de la vasculatura local es la causa de la formación de un edema. A menudo esta es una consecuencia de procesos inflamatorios que cambia la arquitectura o la formación de neovascularización inmadura, permeable.

La formación de un edema macular puede conducir a un deterioro rápido de la agudeza visual porque se deteriora el suministro de nutrientes retinianos y de otras moléculas de señalización.

SDF-1 contribuye a varios factores que pueden conducir a la formación de un edema. Mediante la inhibición de la expresión de la proteína de unión estrecha (Butler et al., 2005), las paredes vasculares se pueden relajar. Esto desencadena además la invasión de leucocitos que pueden crear un entorno pro-inflamatorio y puede estimular la expresión de VEGF (Liang et al., 2007; Salcedo et al., 1999), que se conocía primero como "factor de permeabilidad vascular", porque su presencia conduce a la formación de vasos permeables.

No estaba claro, si la inhibición de SDF-1, por ejemplo, mediante ácidos nucleicos que se unen a SDF-1 como se describe en esta invención, conduciría a cualquier efecto fisiológico, como SDF-1 sólo se expresa a bajos niveles en ojos sanos (Lima y Silva et al., 2007).

Se ensayó un ácido nucleico que se une a SDF en un modelo de conejo de permeabilidad vascular retiniana inducida por VEGF. La permeabilidad que se observó con fluorimetría no era debido a la acción directa a corto

plazo de la inyección de VEGF intravítrea sino más bien por cascadas, que se desencadenan y responden más lentamente (Edelman et al., 2005). El ácido nucleico de unión a SDF-1 reduce significativamente la permeabilidad de una manera dependiente de la dosis.

Inhibición de la vasculogénesis complementaria a o después de un fallo en la inhibición de VEGF

5 Recientemente, Reddy et al., han demostrado que SDF-1 puede promover el crecimiento de tumores vasculares incluso con poco VEGF presente. La ruta independiente de VEGF para la promoción de la neovasculatura (Reddy, Zhou et al., 2008) parece ser secundaria. Interferir en la señalización de SDF-1 mediante ácidos nucleicos que se unen a SDF-1 tal como los de la presente invención puede, por tanto, ser beneficioso como un tratamiento anti-angiogénesis. Esto puede ser especialmente ventajoso en pacientes que no responden a anti-VEGF, en pacientes  
10 refractarios de la terapia anti-VEGF, o en terapia de combinación con fármacos anti VEGF para todas las indicaciones que implican angiogénesis, más específicamente en enfermedades retinianas proliferativas, en las que las enfermedades retinianas proliferativas se seleccionan de DMRE, RD, y oclusión de la vena retiniana, y en cáncer, tumores sólidos y metástasis preferiblemente.

15 Los fármacos que inhiben la función de VEGF incluyen pero no se limitan a Bevacizumab (Avastin), Pegaptanib (Macugen) y Ranibizumab (Lucentis).

20 En la medida de lo posible, las moléculas de ácido nucleico de SDF-1 descritas en la presente memoria se pueden emplear para la fabricación de un medicamento, en el que el medicamento es para la terapia de combinación con un medicamento que inhibe VEGF y/o para uso en sujetos que responden débilmente o no responden a un medicamento que inhibe VEGF. Débilmente como se emplea en la presente memoria en relación con la respuesta a cualquier terapia concerniente a cualquier aspecto de la presente solicitud, significa en este contexto que no se consigue la remisión de la enfermedad.

Síndrome WHIM

25 El síndrome WHIM es una deficiencia autoinmune que se caracteriza a menudo por una forma truncada del receptor CXCR4. Esto conduce a un incremento de la sensibilización por el ligando SDF-1 (CXCL-12) y, por tanto, a una quimiotaxis más fuerte. Por lo tanto, para conseguir un tráfico normal de células madre es beneficioso una menor concentración de SDF-1 activo biológicamente en el cuerpo con un agente bloqueante de SDF-1 similar a la molécula de ácido nucleico según la presente invención o para uso un bloqueador del receptor de CXCR4 (Lagana, Chow et al., 2008).

30 La separación y/o reducción de células similares a las células progenitoras y/o células madre, células plasmáticas de vida larga, células B de memoria y/o células T de memoria del cuerpo, preferiblemente de la sangre, puede realizarse mediante aféresis, clasificación celular y citometría de flujo.

35 La aféresis es una tecnología en la que la sangre de un sujeto se pasa a través de un aparato que separa un constituyente o grupo de constituyentes particular y devuelve el resto a la circulación. Dependiendo de las sustancias y/o células a eliminar, se emplearon diferentes procesos en las aféresis que incluyen el cultivo de células madre, procedimientos de absorción y cromatografía de afinidad.

La leucoféresis es un procedimiento de laboratorio en el que células blancas sanguíneas se separan de una muestra de sangre. Esto se puede realizar para disminuir un recuento celular muy alto en individuos con cáncer (leucemia) o para eliminar células sanguíneas por transfusión.

40 La clasificación celular es un proceso en el que se separan poblaciones mezcladas de células en dos o más poblaciones como se muestra por ejemplo por citometría de flujo, preferiblemente clasificación celular activada por fluorescencia (FACS, de sus siglas en inglés) y clasificación celular activada magnéticamente (FACS).

45 La citometría de flujo es una técnica para el recuento, examinación, y clasificación de partículas microscópicas similares a distintas poblaciones de células suspendidas en una corriente de fluido. Esto permite el análisis multiparamétrico simultáneo de las características físicas y/o químicas de células individuales a través de un aparato de detección óptico y/o electrónico. La clasificación de células activadas por fluorescencia es un tipo especializado de citometría de flujo. Éste proporciona un método para clasificar una mezcla heterogénea de células biológicas en dos o más recipientes, una célula en un momento, basado en la dispersión de luz específica y en las características fluorescentes de cada célula. La tinción fluorescente de un partícula/célula se puede realizar mediante incubación de las partículas/células con un tinte fluorescente que se une a las partículas/célula. Es un instrumento científico útil  
50 porque proporciona rapidez, un registro objetivo y cuantitativo o señales fluorescentes de células individuales así como una separación física de células de particular interés. El acrónimo FACS es un nombre comercial y propio de Becton Dickinson. La clasificación de células activadas por magnetismo (MACS) es una marca comercial registrada por Miltenyi Biotec para un método para la separación de varias poblaciones celulares dependiendo de sus antígenos de superficie (moléculas CD). De este modo la mezcla de células a separar se incuba con perlas magnéticas recubiertas con anticuerpos frente a un antígeno de superficie particular. Esto causa que las células expresen este antígeno para unirse a las perlas magnéticas. Posteriormente la disolución celular se transfiere a una columna colocada en un campo magnético fuerte. En esta etapa, las células unidas a las perlas (que expresan el  
55

antígeno) permanecen en la columna, mientras que otras células (que no expresan el antígeno) fluyen a través. Con este método, las células se pueden separar positiva o negativamente con respecto al antígeno o antígenos en particular.

5 En otra realización, el medicamento comprende un agente activo farmacéuticamente. Tales otros compuestos activos farmacéuticamente se pueden conocer por los expertos en la técnica y se seleccionan preferiblemente del grupo que comprende quimioquina o antagonistas de citoquina, corticosteroides, y similares. Se entenderá por el experto en la técnica que dadas las distintas indicaciones que se pueden abordar de acuerdo con la presente invención por los ácidos nucleicos según la presente invención, dicho agente o agentes activos farmacéuticamente puede ser cualquiera que en principio sea adecuado para el tratamiento y/o prevención de tales enfermedades. Las moléculas de ácido nucleico según la presente invención, particularmente si se presentan o emplean como un medicamento, se combinan preferiblemente con el factor de estimulación de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF), Interleuquina-1 (IL-1), Interleuquina-3 (IL-3), Interleukina-8 (IL-8), PIXY-321 (proteína de fusión 3 GM-CSF/IL-3), proteína inflamatoria de macrófagos (MIP), factor de células madre, trombopoyetina y oncogen relacionado con el crecimiento, como agentes en solitario o en combinación.

15 Alternativamente, o adicionalmente, tal otro agente activo farmacéuticamente es un ácido nucleico según la presente invención. Alternativamente, el medicamento comprende al menos uno o más ácidos nucleicos que se unen a una molécula diana diferente a SDF-1 o muestra una función que es diferente a la uno de los ácidos nucleicos según la presente invención.

20 Como será reconocido por los expertos en la técnica los ácidos nucleicos inventivos se pueden emplear realmente en cualquier enfermedad donde se pueda administrar un antagonista de SDF-1 a un paciente que necesite de tal antagonista y tal antagonista sea adecuado para eliminar la causa de la enfermedad o el trastorno o al menos para reducir los efectos de la enfermedad o del trastorno. Tales efectos incluyen, pero no se limitan a, neovascularización patológica, inflamación y metástasis. La aplicabilidad de los ácidos nucleicos según la presente invención en relación con éstas y otras enfermedades o trastornos resultantes de, entre otros, la implicación de SDF-1 como se indicó en la parte introductoria de la presente memoria que se incorpora en la presente memoria por referencia con el fin de evitar cualquier repetición innecesaria.

En una realización del medicamento de la presente invención, tal medicamento es para uso en combinación con otros tratamientos para cualquiera de las enfermedades descritas en la presente memoria, particularmente aquellas para las que se emplea el medicamento de la presente invención.

30 Una "terapia de combinación" (o "coterapia") incluye la administración de un medicamento de la invención y al menos un segundo agente como parte de un régimen de tratamiento específico, destinado a proporcionar el efecto beneficioso a partir de la acción conjunta de estos agentes terapéuticos, es decir, el medicamento de la presente invención y dicho segundo agente. El efecto beneficioso de la combinación incluye, pero no se limita a, una acción conjunta farmacocinética o farmacodinámica resultante de la combinación de agentes terapéuticos. La administración de estos agentes terapéuticos en combinación, normalmente se lleva a cabo durante un período de tiempo definido (normalmente minutos, horas, días o semanas dependiendo de la combinación seleccionada).

35 Una "terapia de combinación" puede intentar incluir, pero no lo hace generalmente, la administración de dos o más de estos agentes terapéuticos como parte de regímenes de monoterapia distintos que a propósito o arbitrariamente dan como resultado las combinaciones de la presente invención. Una "terapia de combinación" se entiende que incluye la administración de estos agentes terapéuticos de una manera secuencial, es decir, en donde cada agente terapéutico se administra en un momento diferente, así como la administración de estos agentes terapéuticos, o al menos dos de los agentes terapéuticos, de una manera sustancialmente simultánea. Una administración sustancialmente simultánea se puede lograr, por ejemplo, mediante la administración a un sujeto de una única cápsula que tiene una proporción fija de cada agente terapéutico o en múltiples cápsulas, individuales para cada uno de los agentes terapéuticos.

40 La administración secuencial o sustancialmente simultánea de cada agente terapéutico puede efectuarse por cualquier vía apropiada que incluyen, pero no se limitan a, vías tópicas, vías orales, vías intravenosas, vías intramusculares y absorción directa a través de tejidos de membranas mucosas. Los agentes terapéuticos se pueden administrar por la misma vía o por vías diferentes. Por ejemplo, un primer agente terapéutico de la combinación seleccionada, se puede administrar mediante inyección, mientras que los otros agentes terapéuticos de la combinación se pueden administrar por vía tópica.

45 Alternativamente, por ejemplo, todos los agentes terapéuticos se pueden administrar por vía tópica o todos los agentes terapéuticos se pueden administrar mediante inyección. La secuencia con la que se administran los agentes terapéuticos no es muy decisiva, a menos que se indique lo contrario. Una "terapia de combinación" también puede incluir la administración de los agentes terapéuticos como se han descrito anteriormente, en otra combinación con otros ingredientes activos biológicamente. Cuando la terapia de combinación comprende además un tratamiento no farmacológico, el tratamiento no farmacológico se puede realizar en cualquier momento adecuado, siempre que se logre un efecto beneficioso de la acción conjunta de la combinación de los agentes terapéuticos y el tratamiento no farmacológico. Por ejemplo, en los casos apropiados, el efecto beneficioso se consigue todavía cuando el

tratamiento no farmacológico se retira temporalmente de la administración de los agentes terapéuticos, quizá durante días o incluso semanas.

5 Como se ha indicado en términos generales anteriores, el medicamento según la presente invención se puede administrar, en principio, en cualquier forma conocida por los expertos en la técnica. Una ruta de administración preferida es la administración sistémica, más preferiblemente mediante administración parenteral, preferiblemente mediante inyección. Alternativamente, el medicamento se puede administrar localmente. Otras vías de administración comprenden la vía intramuscular, intraperitoneal y subcutánea, oralmente, intranasal, intratraqueal o pulmonar, con una preferencia dada a la vía de administración que sea menos invasiva, garantizando al mismo tiempo la eficacia.

10 La administración parenteral se utiliza generalmente para las inyecciones e infusiones subcutáneas, intramusculares o intravenosas. Además, un enfoque para la administración parenteral emplea la implantación de sistemas de liberación lenta o de liberación sostenida, que aseguran el mantenimiento de un nivel constante de dosificación, que son bien conocidos por el experto habitual en la técnica.

15 Además, los medicamentos preferidos de la presente invención se pueden administrar en forma intranasal mediante el uso tópico de vehículos intranasales, inhalantes adecuados o mediante vías transdérmicas, usando las formas de parches cutáneos transdérmicos bien conocidos por los expertos habituales en la técnica. Para una administración en forma de un sistema de suministro transdérmico, la administración de la dosificación será, por supuesto, continua en lugar de intermitente durante todo el régimen de dosificación. Otras preparaciones tópicas preferidas incluyen cremas, pomadas, lociones, aerosoles y geles, en donde la concentración del agente activo estará en el intervalo del 0,01% al 15%, p/p o p/v.

20 Además de la administración directa al sujeto, los medicamentos preferidos de la presente invención se pueden emplear en protocolos de tratamiento ex vivo para preparar cultivos celulares que se emplean después para reponer las células sanguíneas del sujeto. El tratamiento ex vivo se puede realizar en células autólogas de sangre periférica o de médula ósea o a partir de aloinjertos de donantes compatibles. La concentración de medicamentos preferidos de la presente invención o en combinación con otros agentes, tal como proteína inflamatoria de macrófagos está dentro de los conocimientos del experto en la técnica.

25 Los sujetos que responden favorablemente al método de la invención incluyen sujetos del ámbito médico y veterinario en general, incluyendo seres humanos y pacientes humanos. Entre otros sujetos para los que son útiles los métodos y medios de la invención, se encuentran los gatos, perros, animales grandes, aves tales como pollos, y similares. En general, son apropiados para la administración del método de la invención cualquier sujeto que se beneficiará de la elevación de las células progenitoras y/o células madre, deseable para el trasplante de células madre.

30 Condiciones típicas que se pueden mejorar o beneficiar de otra manera mediante el método y los medios de la invención incluyen trastornos hematopoyéticos, tales como anemia aplásica, leucemias, anemias inducidas por fármacos, y déficit hematopoyéticos a partir de quimioterapia o terapia de radiación. El método y los medios de la invención son también útiles para mejorar el éxito del trasplante durante y después de tratamientos inmunosupresivos así como efectuar una cicatrización de heridas y un tratamiento de inflamación bacteriana más eficaz. El método de la presente invención es además útil para tratar sujetos que son inmunosuprimidos o que tienen el sistema inmune lesionado de otra manera. Condiciones típicas que se mejoran o se benefician de otra manera mediante el método de la presente invención, incluyen a los sujetos infectados con el retrovirus, y más específicamente que están infectados con el virus de inmunodeficiencia humano (VIH). El método de la invención, por tanto, se dirige a un amplio espectro de condiciones para el aumento de células progenitoras y/o células madre en un sujeto que se podría beneficiar o, donde sería beneficioso el cultivo de células progenitoras y/o células madre para el posterior trasplante de células madre.

45 El ácido nucleico de la presente invención, en una realización, se administra también para regenerar el miocardio mediante la movilización de células madre de la médula ósea.

El medicamento de la presente invención generalmente comprenderá una cantidad eficaz del o de los componentes activos de la terapia, que incluyen, pero no se limitan a, una molécula de ácido nucleico de la presente invención, disuelta o dispersa en un medio aceptable farmacéuticamente. Medios o vehículos aceptables farmacéuticamente incluyen cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, y similares. El uso de tales medios y agentes con sustancias activas farmacéuticas es bien conocido en la técnica. También se pueden incorporar ingredientes activos complementarios en el medicamento de la presente invención.

55 En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica. Tal composición farmacéutica comprende al menos uno de los ácidos nucleicos según la presente invención y, preferiblemente, un aglutinante aceptable farmacéuticamente. Tal aglutinante puede ser cualquier aglutinante utilizado y/o conocido en la técnica. Más particularmente, un aglutinante de este tipo es cualquier aglutinante como se describe en relación con

la preparación del medicamento descrito en la presente memoria. En una realización adicional, la composición farmacéutica comprende un agente farmacéuticamente activo adicional.

La preparación de un medicamento y una composición farmacéutica será conocida por los expertos en la técnica a la luz de la presente descripción. Normalmente, tales composiciones se pueden preparar como inyectables, bien como disoluciones o como suspensiones líquidas; formas sólidas adecuadas para disolución en, o suspensión en, un líquido antes de la inyección; como comprimidos u otros sólidos para administración oral; como cápsulas de liberación sostenida; o en cualquier otra forma usada en la actualidad, incluyendo gotas para los ojos, cremas, lociones, pomadas, inhalantes, y similares. El uso de formulaciones estériles, tales como lavados a base de solución salina, por parte de cirujanos, médicos o trabajadores sanitarios para el tratamiento de un área en particular en el campo de operación, también puede ser particularmente útil. Las composiciones también se pueden administrar mediante un microdispositivo, una micropartícula o una esponja.

Después de la formulación, un medicamento se administrará de una manera compatible con la formulación de dosificación, y en una cantidad tal que sea eficaz farmacológicamente. Las formulaciones se administran fácilmente en una variedad de formas de dosificación, tales como el tipo de disoluciones inyectables descritas anteriormente, pero también se pueden emplear las cápsulas de liberación de fármaco, y similares.

En este contexto, la cantidad del ingrediente activo y el volumen de la composición a administrar depende del individuo o sujeto a tratar. Las cantidades específicas del compuesto activo requeridas para la administración dependen del juicio del practicante y son particulares de cada individuo.

Normalmente se utiliza un volumen mínimo de un medicamento para dispersar los compuestos activos. Los regímenes de administración adecuados son también variables, pero se tipificaría mediante la administración inicial del compuesto y el control de los resultados, y proporcionando después las dosis controladas a intervalos adicionales.

Por ejemplo, para administración oral en la forma de una cápsula o comprimido (por ejemplo, cápsula de gelatina), el componente del fármaco activo, es decir, la molécula de ácido nucleico de la presente invención y/o cualquier otro agente activo farmacéuticamente, también referido en la presente memoria como agente o agentes terapéuticos o compuesto o compuestos activos se pueden combinar con un vehículo inerte oral, no tóxico, aceptable farmacéuticamente, tal como etanol, glicerol, agua, y similares. Por otra parte, cuando se desea o es necesario, se pueden incorporar también a la mezcla aglutinantes adecuados, agentes disgregantes, y agentes colorantes. Aglutinantes adecuados incluyen almidón, silicato de aluminio y magnesio, pasta de almidón, gelatina, metilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica y/o polivinilpirrolidona, azúcares naturales tales como glucosa o beta-lactosa, edulcorantes de maíz, gomas naturales y sintéticas tales como de acacia, tragacanto o alginato sódico, polietilenglicol, ceras, y similares. Lubricantes empleados en estas formas de dosificación incluyen oleato de sodio, estearato de sodio, estearato de magnesio, benzoato de sodio, acetato de sodio, cloruro de sodio, sílice, talco, su sal de magnesio o calcio y/o polietilenglicol, y similares. Los disgregantes incluyen, sin limitación, almidón, metilcelulosa, agar, bentonita, almidones de goma xantana, agar, ácido alginico o su sal de sodio, o mezclas efervescentes, y similares. Diluyentes incluyen, por ejemplo, lactosa, dextrosa, sacarosa, manitol, sorbitol, celulosa y/o glicina.

El medicamento de la invención se puede administrar también en tales formas de dosificación oral como comprimidos o cápsulas de liberación sostenida, píldoras, polvos, gránulos, elixires, tinturas, suspensiones, jarabes y emulsiones. Los supositorios se preparan ventajosamente a partir de emulsiones o suspensiones grasas.

La composición farmacéutica o el medicamento se puede esterilizar y/o contener adyuvantes, tales como agentes conservantes, estabilizantes, humectantes o emulsionantes, promotores de solución, sales para regular la presión osmótica y/o tampones. Además, también pueden contener otras sustancias terapéuticamente valiosas. Las composiciones se preparan de acuerdo con métodos convencionales de mezclado, granulación o recubrimiento y normalmente contienen aproximadamente 0,1% a 75%, preferiblemente aproximadamente 1% a 50%, del ingrediente activo.

Las composiciones líquidas, particularmente inyectables se pueden preparar, por ejemplo, disolviendo, dispersando, etc. El compuesto activo se disuelve o se mezcla con un disolvente farmacéuticamente puro tal como, por ejemplo, agua, disolución salina, dextrosa acuosa, glicerol, etanol y similares, para formar de este modo la disolución o suspensión inyectable. Adicionalmente, se pueden formular formas sólidas adecuadas para disolver en líquido antes de la inyección.

Para composiciones sólidas, los excipientes incluyen grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, talco, celulosa, glucosa, sacarosa, carbonato de magnesio, y similares. El compuesto activo definido anteriormente, se puede formular como supositorios, empleando por ejemplo, polietilenglicoles, por ejemplo, propilenglicol, como el vehículo. En algunas realizaciones, los supositorios se preparan de manera ventajosa a partir de emulsiones o suspensiones grasas.

Los medicamentos y las moléculas de ácido nucleico, respectivamente, de la presente invención también se pueden administrar en forma de sistemas de liberación de liposomas, tales como vesículas unilamelares pequeñas, vesículas unilamelares grandes y vesículas multilamelares. Los liposomas se pueden formar a partir de una variedad

de fosfolípidos, que contienen colesterol, estearilamina o fosfatidilcolinas. En algunas realizaciones, una película de componentes lipídicos se hidrata con una disolución acuosa de fármaco para proporcionar una capa en forma de lípidos que encapsula el fármaco, lo que es bien conocido por el experto habitual en la técnica. Por ejemplo, las moléculas de ácido nucleico descritas en la presente memoria se pueden proporcionar como un complejo con un compuesto lipófilo o no inmunogénico, un compuesto de alto peso molecular construido usando métodos conocidos en la técnica. Adicionalmente, los liposomas pueden tener tales moléculas de ácido nucleico en su superficie para dirigirse a una diana y transportar agentes citotóxicos internamente para mediar en la muerte celular. Un ejemplo de complejos asociados a ácido nucleico se proporciona en el documento de Patente de EE.UU. N° 6.011.020.

Los medicamentos y las moléculas de ácido nucleico, respectivamente, de la presente invención también se pueden acoplar con polímeros solubles como vehículos de fármacos dirigibles. Tales polímeros pueden incluir polivinilpirrolidona, copolímero de pirano, polihidroxipropil-metacrilamida-fenol, polidroxietilspanamidafenol o polietileno oxidopoliisina sustituida con restos de palmitoilo. Además, los medicamentos y las moléculas de ácido nucleico, respectivamente, de la presente invención se pueden acoplar a una clase de polímeros biodegradables útiles para conseguir la liberación controlada de un fármaco, por ejemplo, ácido poliláctico, poli(épsilon caprolactona), poli(ácido hidroxi-butírico), poliortoésteres, poliacetales, polidihidropiranos, policianoacrilatos y copolímeros de bloques reticulados o anfipáticos de hidrogeles.

Si se desea, la composición farmacéutica y el medicamento, respectivamente, que se va a administrar también pueden contener cantidades menores de sustancias auxiliares no tóxicas, tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponadores del pH y otras sustancias tales como, por ejemplo, acetato de sodio y oleato de trietanolamina.

El régimen de dosificación que emplea las moléculas de ácido nucleico y los medicamentos, respectivamente, de la presente invención se selecciona de acuerdo con una variedad de factores que incluyen el tipo, especie, edad, peso, sexo y estado médico del paciente; la gravedad de la afección a tratar; la vía de administración; la función renal y hepática del paciente; y el aptámero o sal particular del mismo empleado. Un médico o un veterinario experto en la materia puede determinar fácilmente y prescribir la cantidad eficaz del fármaco requerido para prevenir, contrarrestar o detener el progreso de la afección.

Los niveles plasmáticos eficaces del ácido nucleico de acuerdo con la presente invención varían preferiblemente de 500 fM a 500  $\mu$ M en el tratamiento de cualquiera de las enfermedades descritas en la presente memoria.

Las moléculas de ácido nucleico y los medicamentos, respectivamente, de la presente invención se pueden administrar preferiblemente en una dosis diaria única, cada dos o tres días, de forma semanal, cada dos semanas, en una dosis única mensual o cada tres meses.

Está dentro de la presente invención que el medicamento, tal como se describe en la presente memoria, constituye la composición farmacéutica descrita en la presente memoria.

También se describe un método para el tratamiento de un sujeto que necesita de tal tratamiento, en donde el método comprende la administración de una cantidad activa farmacéuticamente de al menos uno de los ácidos nucleicos según la presente invención. En una realización, el sujeto padece una enfermedad o tiene riesgo de desarrollar tal enfermedad, en donde la enfermedad es cualquiera de las descritas en la presente memoria, particularmente cualquiera de las enfermedades descritas en relación con el uso de cualquiera de los ácidos nucleicos según la presente invención para la fabricación de un medicamento.

Tal y como se utiliza preferiblemente en la presente memoria, el término tratamiento comprende en una realización preferida de forma adicional o alternativamente, prevención y/o seguimiento.

Tal y como se utiliza preferiblemente en la presente memoria, los términos enfermedad y trastorno se utilizan de forma intercambiable, si no se indica lo contrario.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término comprende, no está destinado preferiblemente a limitar la materia objeto seguida o descrita por dicho término. Sin embargo, en una realización alternativa el término comprende se entenderá en el sentido de que contiene, y por lo tanto, como limitante de la materia objeto seguida o descrita por dicho término.

Las diversas SEQ ID NOs, la naturaleza química de las moléculas de ácido nucleico según la presente invención y las moléculas diana SDF-1 tal y como se utilizan en la presente memoria, la secuencia real de las mismas y el número de referencia interno, se resumen en la siguiente tabla.

Se debe tener en cuenta que los ácidos nucleicos se caracterizaron en el aptámero, es decir, a nivel de ácido nucleico D (D-ARN) con D-SDF-1 humana biotinilada (SEQ ID NO: 4) o a nivel de Spiegelmero, es decir, ácido nucleico L (L-ARN) con la configuración natural de SDF-1, L-SDF- 1 (SDF-1 $\alpha$  humana, SEQ ID NO: 1). Los diferentes ácidos nucleicos comparten un nombre de referencia interna, pero una SEQ ID NO: para la molécula de D-ARN (aptámero) y una SEQ ID NO: para la molécula de L-ARN (Spiegelmero), respectivamente.

TABLA 1 (A)

Sec-ID	ARN/Péptido	Secuencia	Referencia Interna
1	L-péptido	KPVSLSYRCPCRFESHVARANVKHLKILNTPNCALQIVARLKNN NRQVCIDPKLKWIQEYLEKALNK	SDF-1 $\alpha$ /humana/mono/gato SDF-1/humana/mono/gato
2	L-péptido	KPVLSYRCPCRFESHVARANVKHLKILNTPNCALQIVARLKNN NRQVCIDPKLKWIQEYLEKALNKRFKM	SDF-1 $\beta$ /humana/mono/gato
3	L-péptido	KPVLSYRCPCRFESHVARANVKHLKILNTPNCALQIVARLKNN NRQVCIDPKLKWIQEYLEKALNK	SDF-1 $\alpha$ de ratón SDF-1 de ratón
4	D-péptido	KPVLSYRCPCRFESHVARANVKHLKILNTPNCALQIVARLKNN NRQVCIDPKLKWIQEYLEKALNKRFK-Biotin	D-SDF-1 humana biotinilado
5	L-ARN (SPIEGELMERO)	GCUGGAAAGCAACAUAGUCAAUAAAAGGUAGCCGACGC	192-A10-001
6	L-ARN (SPIEGELMERO)	GCUGGAAAGUAACAUAGUCAAUAAAAGGUAAACCACAGC	192-G10
7	L-ARN (SPIEGELMERO)	GCUGGAAAGUAACACGUCAAUGAAAAGGUAAACCACAGC	192-F10
8	L-ARN (SPIEGELMERO)	GCUGGAAAGUAACACGUCAAUGAAAAGGUAAACCACAGC	192-B11
9	L-ARN (SPIEGELMERO)	GCUGAAAAGUAACAUAGUCAAUAAAAGGUAAACUACAGC	192-C9
10	L-ARN (SPIEGELMERO)	GCUGAAAAGUAACAUAGUCAAUAAAAGGUAAACUACAGC	192-E10
11	L-ARN (SPIEGELMERO)	GCUGGAAAGUAACAUAGUCAAUAAAAGGUAAACCACAGC	192-C10
12	L-ARN (SPIEGELMERO)	GCAGGAAAGUAACAUAGUCAAUAAAAGGUAAACCACAGC	192-D11
13	L-ARN (SPIEGELMERO)	GCUGGAAAGUAACAUAGUCAAUAAAAGGUAAACCACUGC	192-G11
14	L-ARN (SPIEGELMERO)	GCUAUGAAAGUAACAUAGUCAAUAAAAGGUAAACCACUAGC	192-H11

TABLA 1 (B)

Sec-ID	ARN/Péptido	Secuencia	Referencia Interna
15	L-ARN (SPIEGELMERO)	GCUGCGAAAGCGACAUGUCAAAUGAAAGGUAGCCGCAGC	192-D10
16	L-ARN (SPIEGELMERO)	GCUGUGAAAGCAACAUGUCAAAUGAAAGGUAGCCACAGC	192-E9
17	L-ARN (SPIEGELMERO)	GCUGUGAAAGUAACAUGUCAAAUGAAAGGUAGCCGCAGC	192-H9
18	L-ARN (SPIEGELMERO)	AGCGUGAAAGUAACACGUAAAAUGAAAGGUAACCACGCU	191-A6
19	L-ARN (SPIEGELMERO)	AAAGYRACAHGUMAA <sub>X<sub>A</sub></sub> UGAAAGGUARC; X <sub>A</sub> = A o ausente	Fórmula-1 Tipo A
20	L-ARN (SPIEGELMERO)	AAAGYRACAHGUMAAUGAAAGGUARC	Fórmula-2 Tipo A
21	L-ARN (SPIEGELMERO)	AAAGYRACAHGUMAAAUGAAAGGUARC	Fórmula-3 Tipo A
22	L-ARN (SPIEGELMERO)	AAAGYAACAUGUCAAAUGAAAGGUARC	Fórmula-4 Tipo A
23	L-ARN (SPIEGELMERO)	RSHRYR	Fórmula-5-5' Tipo A
24	L-ARN (SPIEGELMERO)	YRYDSY	Fórmula-5-3' Tipo A
25	L-ARN (SPIEGELMERO)	CUGUGAAAGCAACAUGUCAAAUGAAAGGUAGCCGCAG	192- A10-002
26	L-ARN (SPIEGELMERO)	UGUGAAAGCAACAUGUCAAAUGAAAGGUAGCCGCA	192- A10-003
27	L-ARN (SPIEGELMERO)	GUGAAAGCAACAUGUCAAAUGAAAGGUAGCCGC	192- A10-004
28	L-ARN (SPIEGELMERO)	UGAAAGCAACAUGUCAAAUGAAAGGUAGCCG	192- A10-005
29	L-ARN (SPIEGELMERO)	GAAAGCAACAUGUCAAAUGAAAGGUAGCC	192- A10-006
30	L-ARN (SPIEGELMERO)	AAAGCAACAUGUCAAAUGAAAGGUAGC	192- A10-007

TABLA 1 (C)

Nombre	ARN/Péptido	Secuencia	Referencia Interna
31	L-ARN (SPIEGELMERO)	GCGUGAAAGCAACAUGCAAUGAAAAGGUAGCCGCGC	192-A10-008
32	L-ARN (SPIEGELMERO)	GCGCGAAAGCAACAUGCAAUGAAAAGGUAGCCGCGC	192-A10-015
33	L-ARN (SPIEGELMERO)	GCGGAAAGCAACAUGCAAUGAAAAGGUAGCCGCGC	192-A10-014
34	L-ARN (SPIEGELMERO)	CGUGAAAGCAACAUGCAAUGAAAAGGUAGCCGCGC	192-A10-016
35	L-ARN (SPIEGELMERO)	GCGCAAAGCAACAUGCAAUGAAAAGGUAGCGUGC	192-A10-017
36	L-ARN (SPIEGELMERO)	GUGCAAAGCAACAUGCAAUGAAAAGGUAGCGCGC	192-A10-018
37	L-ARN (SPIEGELMERO)	CGCGAAAGCAACAUGCAAUGAAAAGGUAGCCGUG	192-A10-019
38	L-ARN (SPIEGELMERO)	GGGCAAAGCAACAUGCAAUGAAAAGGUAGCGCCC	192-A10-020
39	L-ARN (SPIEGELMERO)	GGCCAAAGCAACAUGCAAUGAAAAGGUAGCGGCC	192-A10-021
40	L-ARN (SPIEGELMERO)	GCCCCAAGCAACAUGCAAUGAAAAGGUAGCGGGC	192-A10-022
41	L-ARN (SPIEGELMERO)	CCCCAAAGCAACAUGCAAUGAAAAGGUAGCGGGG	192-A10-023
42	L-ARN (SPIEGELMERO)	X <sub>2</sub> BBBS; X <sub>2</sub> = S o ausente	Fórmula-6-5' Tipo A
43	L-ARN (SPIEGELMERO)	SBBVX <sub>3</sub> ; X <sub>3</sub> = S o ausente	Fórmula-6-3' Tipo A
44	L-ARN (SPIEGELMERO)	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> NNBV; X <sub>1</sub> = R o ausente X <sub>2</sub> = S o ausente	Fórmula-7-5' Tipo A
45	L-ARN (SPIEGELMERO)	BNBNX <sub>3</sub> X <sub>4</sub> ; X <sub>3</sub> = R o ausente X <sub>4</sub> = Y o ausente	Fórmula-7-3' Tipo A
46	L-ARN (SPIEGELMERO)	AGCGUGGUGUGAUCUAGAUGAGUGGCUGAUCUAGGUAUCAGGUAUCGCU	193-C2-001
47	L-ARN (SPIEGELMERO)	AGCGUGGUGUGAUCUAGAUGAUUUGGCUGAUCUAGGUAUCGCU	193-G2-001

TABLA 1 (D)

Sec.-ID	ARN/Péptido	Secuencia	Referencia Interna
48	L-ARN (SPIEGELMERO)	AGCGUGGUGAUCUAGAUGAAUGGCUGAUCUAGUCAGGUGCGCU	193-F2-001
49	L-ARN (SPIEGELMERO)	GCGAGGUGUGAUCUAGAUGAGUGGCUGAUCCUAGUCAGGUGCGC	193-G1-002
50	L-ARN (SPIEGELMERO)	GCGUGGUGUGAUCUAGAUGAGUGGCUGAUCUAGUCAAGGUGCGC	193-D2-002
51	L-ARN (SPIEGELMERO)	GCAUGGUGUGAUCUAGAUGAGUGGCUGAUCUAGUCAAGGUGCGCC	193-A1-002
52	L-ARN (SPIEGELMERO)	GCGUGGUGUGAUCUAGAUGAAUGGCUGAUCUAGUCAGGGACGC	193-D3-002
53	L-ARN (SPIEGELMERO)	GCGUGGUGUGAUCUAGAUGAGAGGCUGAUCUAGUCAGGUACGC	193-B3-002
54	L-ARN (SPIEGELMERO)	GCGUGGUGUGAUCUAGAUGAAAGGCUGAUCUAGUCAGGUACGC	193-H3-002
55	L-ARN (SPIEGELMERO)	GCGUGGUGUGAUCUAGAUGAGUGGCUGUCCUAGUCAGGUAGUC	193-E3-002
56	L-ARN (SPIEGELMERO)	GCGUGGUGUGAUCUAGAUGAGUGGCUGAUCUAGUUAGGUACGC	193-D1-002
57	L-ARN (SPIEGELMERO)	GUGUGAUCUAGAUGUADWGGCUGWUCCUAGUYAGG	Fórmula-1 Tipo B
58	L-ARN (SPIEGELMERO)	GUGUGAUCUAGAUGUADUGGCUGAUCUAGUCAGG	Fórmula-2 Tipo B
59	L-ARN (SPIEGELMERO)	$X_1$ GCRWG; $X_1 = A$ o ausente	Fórmula-3-5' Tipo B
60	L-ARN (SPIEGELMERO)	KRYSC $X_4$ ; $X_4 = U$ o ausente	Fórmula-3-3' Tipo B
61	L-ARN (SPIEGELMERO)	GCGUGGUGUGAUCUAGAUGAGUGGCUGAUCUAGUCAGGUACGC	193-C2-002
62	L-ARN (SPIEGELMERO)	CGUGGUGUGAUCUAGAUGAGUGGCUGAUCUAGUCAGGUACGC	193-C2-003



TABLA 1 (F)

Sec.-ID	ARN/Péptido	Secuencia	Referencia Interna
79	L-ARN (SPIEGELMERO)	GUGCUGCGGGGUUAGGGCUAGAAGUCGGCCUGCAGCAC	197-B2
80	L-ARN (SPIEGELMERO)	AGCUGCGCAGGUUAGGGCUAGAAGUCGGUCGACACGCU	191-D5-001
81	L-ARN (SPIEGELMERO)	GUUUCCGGAGGUUAGGGCUAGAAGUCGGUCAGCAGCAC	197-H1
82	L-ARN (SPIEGELMERO)	CGUCGCUUAGAUAGGGGUUAGGGCUUAAAGUCGGCUGAUUCACG	190-A3-001
83	L-ARN (SPIEGELMERO)	AGCUGAAGGGGUUAGGGCUCGAAAGUCGGCUGACACGCU	191-A5
84	L-ARN (SPIEGELMERO)	GUGCUGCGGGGUUAGGGCUCGAAAGUCGGCCCGCAGCAC	197-H3
85	L-ARN (SPIEGELMERO)	GUUUCCCGGGGUUAGGGCUUGAAAGUCGGCCCGCAGCAC	197-B1
86	L-ARN (SPIEGELMERO)	GUUUCCAGGGGUUAGGGCUUGAAAGUCGGCCUGCAGCAC	197-E3
87	L-ARN (SPIEGELMERO)	GUGCUGCGGGGUUAGGGCUCAAAAGUCGGCCUGCAGCAC	197-H2
88	L-ARN (SPIEGELMERO)	GUGCUGCGGGGUUAGGGCUAA-AGUCGGCCGACAGCAC	197-D1
89	L-ARN (SPIEGELMERO)	GUGCUGGGGGUCAGGGCUAGAAGUCGGCCUGCAGCAC	197-D2
90	L-ARN (SPIEGELMERO)	GGUYAGGCUHRX <sub>A</sub> AGUCGG; X <sub>A</sub> = A o ausente	Fórmula-1 Tipo C
91	L-ARN (SPIEGELMERO)	GGUYAGGCUHRAAGUCGG	Fórmula-2 Tipo C
92	L-ARN (SPIEGELMERO)	GGUYAGGCUHRAAGUCGG	Fórmula-3 Tipo C
93	L-ARN (SPIEGELMERO)	GGUUAGGCUHGAAAGUCGG	Fórmula-4 Tipo C
94	L-ARN (SPIEGELMERO)	UGAGAUAGGGGUUAGGGCUUAAAGUCGGCUGAUUCUCA	190-A3-003

TABLA 1 (G)

Sec-ID	ARN/Péptido	Secuencia	Referencia Interna
95	L-ARN (SPIEGELMERO)	GAGAUAGGGGUUAGGGCUUAAAGUCGGCUGAUUCUC	190-A3-004
96	L-ARN (SPIEGELMERO)	GGGGUUAGGGCUUAAAGUCGGCUGAUUCU	190-A3-007
97	L-ARN (SPIEGELMERO)	GCGUGGCGAGGUUAGGGCUAGAAGUCGGUCGACACGC	191-D5-002
98	L-ARN (SPIEGELMERO)	CGUGGCGAGGUUAGGGCUAGAAGUCGGUCGACACG	191-D5-003
99	L-ARN (SPIEGELMERO)	CGGGCGAGGUUAGGGCUAGAAGUCGGUCGACCG	191-D5-004
100	L-ARN (SPIEGELMERO)	CGGGCGAGGUUAGGGCUAGAAGUCGGUCGCCCG	191-D5-005
101	L-ARN (SPIEGELMERO)	CGGCGAGGUUAGGGCUAGAAGUCGGUCGCCG	191-D5-006
102	L-ARN (SPIEGELMERO)	CGGGAGGUUAGGGCUAGAAGUCGGUCCCG	191-D5-007
103	L-ARN (SPIEGELMERO)	GGGAGGUUAGGGCUAGAAGUCGGUCCC	191-D5-010
104	L-ARN (SPIEGELMERO)	CCGCGGUUAGGGCUAGAAGUCGGGCGG	191-D5-017
105	L-ARN (SPIEGELMERO)	CCCGGGUUAGGGCUAGAAGUCGGCGGG	191-D5-029
106	L-ARN (SPIEGELMERO)	GGCGGGUUAGGGCUAGAAGUCGGCGCC	191-D5-024
107	L-ARN (SPIEGELMERO)	CCCGCGUUAGGGCUAGAAGUCGGGCGGG	191-D5-017-29a
108	L-ARN (SPIEGELMERO)	GCCGCGUUAGGGCUAGAAGUCGGGCGGC	191-D5-017-29b
109	L-ARN (SPIEGELMERO)	CCCCGGUUAGGGCUAGAAGUCGGCGGGG	191-D5-019-29a
110	L-ARN (SPIEGELMERO)	CGGCGGGUUAGGGCUAGAAGUCGGCGCCG	191-D5-024-29a
111	L-ARN (SPIEGELMERO)	GGGCGGGUUAGGGCUAGAAGUCGGCGCCC	191-D5-024-29b

TABLA 1 (H)

Sec.-ID	ARN/Péptido	Secuencia	Referencia Interna
112	L-ARN (SPIEGELMERO)	UGCUGCGGGGGUUAGGGCUAGAAGUCGGCCUGCAGCA	197-B2-001
113	L-ARN (SPIEGELMERO)	GCUGCGGGGGUUAGGGCUAGAAGUCGGCCUGCAGC	197-B2-002

(continuación)

Sec.-ID	ARN/Péptido	Secuencia	Referencia Interna
114	L-ARN (SPIEGELMERO)	CUGGGGGGGUUAGGGCUAGAAGUCGGCCUGCAG	197-B2-003
115	L-ARN (SPIEGELMERO)	UGCGGGGGUUAGGGCUAGAAGUCGGCCUGCA	197-B2-004
116	L-ARN (SPIEGELMERO)	GCGGGGGUUAGGGCUAGAAGUCGGCCUGC	197-B2-005
117	L-ARN (SPIEGELMERO)	GCCGGGGUUAGGGCUAGAAGUCGGCCGGC	197-B2-006
118	L-ARN (SPIEGELMERO)	GGCCGGGGUUAGGGCUAGAAGUCGGCCGGCC	197- B2-006-31a
119	L-ARN (SPIEGELMERO)	CGCCGGGGUUAGGGCUAGAAGUCGGCCGGCG	197- B2-006-31b
120	L-ARN (SPIEGELMERO)	RKSBUSNVGR	Fórmula 5-5' Tipo C
121	L-ARN (SPIEGELMERO)	YINRCASSMY	Fórmula 5-3' Tipo C
122	L-ARN (SPIEGELMERO)	RKSBUGSVGR	Fórmula 6-5' Tipo C
123	L-ARN (SPIEGELMERO)	YCNRCASSMY	Fórmula 6-3' Tipo C
124	L-ARN (SPIEGELMERO)	$X_5$ SSSV; $X_5 = S$ o ausente	Fórmula 7-5' Tipo C
125	L-ARN (SPIEGELMERO)	BSSSX <sub>5</sub> ; $X_5 = S$ o ausente	Fórmula 7-3' Tipo C
126	L-ARN (SPIEGELMERO)	SGGSV	Fórmula 8-5' Tipo C
127	L-ARN (SPIEGELMERO)	YSCCS	Fórmula 8-3' Tipo C

TABLA 1 (I)

Sec.-ID	ARN/Péptido	Secuencia	Referencia Interna
128	L-ARN- (SPIEGELMERO)	GCSGG	Fórmula-9-5' Tipo C
129	L-ARN- (SPIEGELMERO)	CCKGC	Fórmula-9-3' Tipo C
130	L-ARN- (SPIEGELMERO)	SSSSR	Fórmula-10-5' Tipo C
131	L-ARN- (SPIEGELMERO)	YSBSS	Fórmula-10-3' Tipo C
132	L-ARN- (SPIEGELMERO)	5'-40 kDa-PEG-GCGUGGUGUGAUCUAGAUGAUUUGGCUGAUCCUAGUCAGGUACGC	193-G2-012-5'-PEG, NOX-A12-JE40
133	L-ARN- (SPIEGELMERO)	5'-40 kDa-PEG-GCGUGAAA GCAACAUGUCAAUAAAAAGGUAGCCGCGC	192-A10-008-5'-PEG
134	L-ARN- (SPIEGELMERO)	5'-40 kDa-PEG-CGGGAGGUUAGGGCUAGAGGUCGGUCCCG	191-D5-007-5'-PEG
135	L-ARN- (SPIEGELMERO)	5'-40 kDa-PEG-GCCCGGGUAGGGCUAGAAGUCGGCCGGC	197-B2-006-5'-PEG
136	L-ARN- (SPIEGELMERO)	5'-40 kDa-PEG-CGCCGGGUUAGGGCUAGAAGUCGGCCGGC	197-B2-006-31b-5'PEG
137	L-ARN- (SPIEGELMERO)	5'-40 kDa-PEG-GCUGUGAAA GCAACAUGUCAAUAAAAAGGUAGCCGCGCAGC	192-A10-001-5'-PEG 192-A10-001-5' - PEG40
138	L-ARN- (SPIEGELMERO)	UAAGGAAACUCGGUCUGAUGCCGGUAGCCGUCGUCAGAGCU	Spiegelmero Control
139	L-ARN- (SPIEGELMERO)	5'-30 kDa-PEG-GCUGUGAAA GCAACAUGUCAAUAAAAAGGUAGCCGCGCAGC	192-A10-001-5'-PEG30

TABLA 1 (J)

Sec.-ID	ARN/Péptido	Secuencia	Referencia Interna
140	L-ARN (SPIEGELMERO)	5'-100 kDa-HES-GCUGUGAAAGCAACAUGUCAUUGAAAGGUA GCCGCAGC	192-A10-001-5-HES100
141	L-ARN (SPIEGELMERO)	5'-130 kDa-HES-GCUGUGAAAGCAACAUGUCAUUGAAAGGUA GCCGCAGC	192-A10-001-5-HES130
142	L-ARN (SPIEGELMERO)	CGUGGCCGUGUGUCAGGUCUAUUCGCCCCGGUCAGGGCAUCCGCG	194-A2-001
143	L-ARN (SPIEGELMERO)	GCAGUGUGACGCGGACGUGUAUGGACAGAGCUGAUCCCGCUCAGGUGAG	196-B12-003
144	L-ARN (SPIEGELMERO)	CAACAGCAGUGUGACGCGGACGUGUAUGGACAGAGCUGAUCCCGCUCAG	196-B12-004
145	D-ARN (APTÁMERO)	GCUGUGAAAGCAACAUGUCAUUGAAAGGUA GCCGCAGC	192-A10-001
146	D-ARN (APTÁMERO)	GCUGUGAAAGUAACAUGUCAUUGAAAGGUA ACCCAGC	192-G10
147	D-ARN (APTÁMERO)	GCUGUGAAAGUAACAUGUCAUUGAAAGGUA ACCCAGC	192-F10
148	D-ARN (APTÁMERO)	GCUGUGAAAGUAACAUGUCAUUGAAAGGUA ACCCAGC	192-B11
149	D-ARN (APTÁMERO)	GCUGUGAAAGUAACAUGUCAUUGAAAGGUA ACUACAGC	192-C9
150	D-ARN (APTÁMERO)	GCUGUGAAAGUAACAUGUCAUUGAAAGGUA ACUACAGC	192-E10
151	D-ARN (APTÁMERO)	GCUGUGAAAGUAACAUGUCAUUGAAAGGUA ACCCAGC	192-C10
152	D-ARN (APTÁMERO)	GCAGUGAAA GUAACAUGUCAUUGAAAGGUA ACCCAGC	192-D11
153	D-ARN (APTÁMERO)	GCUGUGAAAGUAACAUGUCAUUGAAAGGUA ACCCAGC	192-G11

TABLA 1 (K)

Sec.-ID	ARN/Péptido	Secuencia	Referencia Interna
154	D-ARN (APTÁMERO)	GCUAUGAAAGUAACAUGUCA AUGAAAGGUAACCAUAGC	192-H11
155	D-ARN (APTÁMERO)	GCUGCGAAAGCGACAUGUCA AUGAAAGGUAGCCGCAGC	192-D10
156	D-ARN (APTÁMERO)	GCUGUGAAAGCAACAUGUCA AUGAAAGGUAGCCACAGC	192-E9
157	D-ARN (APTÁMERO)	GCUGUGAAAGUAACAUGUCA AUGAAAGGUAGCCGCAGC	192-H9
158	D-ARN (APTÁMERO)	AGCGUGAAAGUAACACGUAAA AUGAAAGGUAACCACGCU	191-A6
159	D-ARN (APTÁMERO)	CUGUGAAAGCAACAUGUCA AUGAAAGGUAGCCGCAG	192-A10-002
160	D-ARN (APTÁMERO)	UGUGAAAGCAACAUGUCA AUGAAAGGUAGCCGCA	192-A10-003
161	D-ARN (APTÁMERO)	GUGAAAGCAACAUGUCA AUGAAAGGUAGCCGC	192-A10-004
162	D-ARN (APTÁMERO)	UGAAAGCAACAUGUCA AUGAAAGGUAGCCG	192-A10-005
163	D-ARN (APTÁMERO)	GAAAGCAACAUGUCA AUGAAAGGUAGCC	192-A10-006
164	D-ARN (APTÁMERO)	AAAGCAACAUGUCA AUGAAAGGUAGC	192-A10-007
165	D-ARN (APTÁMERO)	GCGUGAAAGCAACAUGUCA AUGAAAGGUAGCCGCGC	192-A10-008
166	D-ARN (APTÁMERO)	GCGCGAAAGCAACAUGUCA AUGAAAGGUAGCCGCGC	192-A10-015
167	D-ARN (APTÁMERO)	GCGGAAAGCAACAUGUCA AUGAAAGGUAGCCCGC	192-A10-014
168	D-ARN (APTÁMERO)	CGUGAAAGCAACAUGUCA AUGAAAGGUAGCCGCG	192-A10-016
169	D-ARN (APTÁMERO)	GCGCAAAGCAACAUGUCA AUGAAAGGUAGCGUGC	192-A10-017

TABLA 1 (L)

Sec.-ID	ARN/Péptido	Secuencia	Referencia Interna
170	D-ARN (APTÁMERO)	GUGCAAAGCAAACAUGUCAUAUGAAAGGUAGCGCGC	192-A10-018
171	D-ARN (APTÁMERO)	CJCGAAAGCAAACAUGUCAUAUGAAAGGUAGCGCGUG	192-A10-019
172	D-ARN (APTÁMERO)	GGCAAAGCAAACAUGUCAUAUGAAAGGUAGCGCGCC	192-A10-020
173	D-ARN (APTÁMERO)	GGCAAAGCAAACAUGUCAUAUGAAAGGUAGCGCGCC	192-A10-021
174	D-ARN (APTÁMERO)	GCCCAAAGCAAACAUGUCAUAUGAAAGGUAGCGCGGC	192-A10-022
175	D-ARN (APTÁMERO)	CCCCAAAGCAAACAUGUCAUAUGAAAGGUAGCGCGGG	192-A10-023
176	D-ARN (APTÁMERO)	AGCGUGGUGUGAUCUAGAUGUAUGUGGCUGAUCUCCUAGUCAGGUACGCU	193-C2-001
177	D-ARN (APTÁMERO)	AGCGUGGUGUGAUCUAGAUGUAUUGGCUGAUCUCCUAGUCAGGUACGCU	193-G2-001
178	D-ARN (APTÁMERO)	AGCGUGGUGUGAUCUAGAUGUAUUGGCUGAUCUCCUAGUCAGGUAGCGCU	193-F2-001
179	D-ARN (APTÁMERO)	GCGAGGUGUGAUCUAGAUGUAUGUGGCUGAUCUCCUAGUCAGGUAGCGC	193-G1-002
180	D-ARN (APTÁMERO)	GCGUGGUGUGAUCUAGAUGUAUGUGGCUGAUCUCCUAGUCAGGUAGCGC	193-D2-002
181	D-ARN (APTÁMERO)	GCAUGGUGUGAUCUAGAUGUAUGUGGCUGAUCUCCUAGUCAGGUAGCGCC	193-A1-002
182	D-ARN (APTÁMERO)	GCGUGGUGUGAUCUAGAUGUAUUGGCUGAUCUCCUAGUCAGGGACGC	193-D3-002
183	D-ARN (APTÁMERO)	GCGUGGUGUGAUCUAGAUGUAUGAGGCUGAUCUCCUAGUCAGGUAGCGC	193-B3-002
184	D-ARN (APTÁMERO)	GCGUGGUGUGAUCUAGAUGUAUUGGCUGAUCUCCUAGUCAGGUAGCGC	193-H3-002

TABLA 1 (M)

Sec.-ID	ARN/Péptido	Secuencia	Referencia Interna
185	D-ARN (APTÁMERO)	GCGUGGUGAUCUAGAUGAUGGCGUGUUCUAGUCAGGUAUGC	193-E3-002
186	D-ARN (APTÁMERO)	GCGUGGUGAUCUAGAUGAUGGCGUGAUCCUAGUAGGUACGC	193-D1-002
187	D-ARN (APTÁMERO)	GCGUGGUGAUCUAGAUGAUGGCGUGAUCCUAGUCAGGUACGC	193-C2-002
188	D-ARN (APTÁMERO)	CGUGGUGAUCUAGAUGAUGGCGUGAUCCUAGUCAGGUACG	193-C2-003
189	D-ARN (APTÁMERO)	GUGGUGAUCUAGAUGAUGGCGUGAUCUAGUCAGGUAC	193-C2-004
190	D-ARN (APTÁMERO)	UGGUGAUCUAGAUGAUGGCGUGAUCCUAGUCAGGUA	193-C2-005
191	D-ARN (APTÁMERO)	GGUGAUCUAGAUGAUGGCGUGAUCCUAGUCAGGU	193-C2-006
192	D-ARN (APTÁMERO)	GUGAUCUAGAUGAUGGCGUGAUCCUAGUCAGG	193-C2-007
193	D-ARN (APTÁMERO)	GCGUGGUGAUCUAGAUGAUUGGCGUAUCCUAGUCAGGUACGC	193-G2-012
194	D-ARN (APTÁMERO)	GCGCGGUGAUCUAGAUGAUUGGCGUAUCCUAGUCAGGCGCGC	193-G2-013
195	D-ARN (APTÁMERO)	GCGCGUGAUCUAGAUGAUUGGCGUAUCCUAGUCAGGCGC	193-G2-014
196	D-ARN (APTÁMERO)	GGCGGUGAUCUAGAUGAUUGGCGUAUCCUAGUCAGGGCCC	193-G2-015
197	D-ARN (APTÁMERO)	GGCCGUGAUCUAGAUGAUUGGCGUAUCCUAGUCAGGGGCC	193-G2-016
198	D-ARN (APTÁMERO)	GCCCGUGAUCUAGAUGAUUGGCGUAUCCUAGUCAGGGGGC	193-G2-017

TABLA 1 (N)

Sec.-ID	ARN/Péptido	Secuencia	Referencia Interna
199	D-ARN (APTÁMERO)	GUGCUGCGGGGUUAGGGCUAGAAGUCGGCCUGCAGCAC	197-B2
200	D-ARN (APTÁMERO)	AGCGUGCGAGGUUAGGGCUAGAAGUCGGUCGACACGCU	191-D5-001
201	D-ARN (APTÁMERO)	GUUUGCGGAGGUUAGGGCUAGAAGUCGGUCAGCAGCAC	197-H1
202	D-ARN (APTÁMERO)	CGUGCGUUGAGAUAGGGUUAAGGGCUAAAAGUCGGCUGAUUCACG	190-A3-001
203	D-ARN (APTÁMERO)	AGCGUGAAGGGGUUAGGGCUCGAAGUCGGCUGACACGCU	191-A5
204	D-ARN (APTÁMERO)	GUGCUGCGGGGUUAGGGCUCGAAGUCGGCCGCGCAGCAC	197-H3
205	D-ARN (APTÁMERO)	GUUUCCCGGGGUUAGGGCUUAGAAGUCGGCCGGCAGCAC	197-B1
206	D-ARN (APTÁMERO)	GUUUGCAGGGGUUAGGGCUUAGAAGUCGGCCUGCAGCAC	197-E3
207	D-ARN (APTÁMERO)	GUGCUGCGGGGUUAGGGCUCAAAGUCGGCCUGCAGCAC	197-H2
208	D-ARN (APTÁMERO)	GUGCUGCGGGGUUAGGGCUAA-AGUCGGCCGACAGCAC	197-D1
209	D-ARN (APTÁMERO)	GUGCUGGGGGUUCAGGGCUAGAAGUCGGCCUGCAGCAC	197-D2
210	D-ARN (APTÁMERO)	UGAGAUAGGGGUUAGGGCUUAAAGUCGGCUGAUUCUCA	190-A3-003
211	D-ARN (APTÁMERO)	GAGAUAGGGGUUAGGGCUUAAAGUCGGCUGAUUCUC	190-A3-004
212	D-ARN (APTÁMERO)	GGGUUAGGGCUUAAAGUCGGCUGAUUCU	190-A3-007
213	D-ARN (APTÁMERO)	GCGUGCGAGGUUAGGGCUAGAAGUCGGUCGACACGC	191-D5-002
214	D-ARN (APTÁMERO)	CGUGCGAGGUUAGGGCUAGAAGUCGGUCGACACG	191-D5-003

ES 2 768 051 T3

TABLA 1 (O)

Sec.-ID	ARN/Péptido	Secuencia	Referencia Interna
215	D-ARN (APTÁMERO)	CGGGCGAGGUUAGGGCUAGAAGUCGGUCGACCG	191-D5-004
216	D-ARN (APTÁMERO)	CGGGCGAGGUUAGGGCUAGAAGUCGGUCGCCCCG	191-D5-005
217	D-ARN (APTÁMERO)	CGGCGAGGUUAGGGCUAGAAGUCGGUCGCCG	191-D5-006
218	D-ARN (APTÁMERO)	CGGGAGGUUAGGGCUAGAAGUCGGUCCCCG	191-D5-007
219	D-ARN (APTÁMERO)	GGGAGGUUAGGGCUAGAAGUCGGUCCC	191-D5-010
220	D-ARN (APTÁMERO)	CCGCGGUUAGGGCUAGAAGUCGGGCGG	191-D5-017
221	D-ARN (APTÁMERO)	CCCGGGUUAGGGCUAGAAGUCGGCGGG	191-D5-029
222	D-ARN (APTÁMERO)	GGCGGGUUAGGGCUAGAAGUCGGCGCC	191-D5-024
223	D-ARN (APTÁMERO)	CCCGCGGUUAGGGCUAGAAGUCGGGCGGG	191-D5-017-29a
224	D-ARN (APTÁMERO)	GCCGCGGUUAGGGCUAGAAGUCGGGCGGC	191-D5-017-29b
225	D-ARN (APTÁMERO)	CCCCGGGUUAGGGCUAGAAGUCGGCGGGG	191-D5-019-29a
226	D-ARN (APTÁMERO)	CGGCGGGUUAGGGCUAGAAGUCGGCGCCG	191-D5-024-29a
227	D-ARN (APTÁMERO)	GGGCGGGUUAGGGCUAGAAGUCGGCGCCC	191-D5-024-29b
228	D-ARN (APTÁMERO)	UGCUGCGGGGUUAGGGCUAGAAGUCGGCCUGCAGCA	197-B2-001

TABLA 1 (P)

Sec.-ID	ARN/Péptido	Secuencia	Referencia Interna
229	D-ARN (APTÁMERO)	GCUGCGGGGUUAGGGCUAGAAGUCGGCCUCGAGC	197-B2-002
230	D-ARN (APTÁMERO)	CUGCGGGGUUAGGGCUAGAAGUCGGCCUCGAG	197-B2-003
231	D-ARN (APTÁMERO)	UGCGGGGUUAGGGCUAGAAAGUCGGCCUGCA	197-B2-004
232	D-ARN (APTÁMERO)	GCGGGGUUAGGGCUAGAAAGUCGGCCUGC	197-B2-005
233	D-ARN (APTÁMERO)	GCCGGGUUAGGGCUAGAAGUCGGCCGGC	197-B2-006
234	D-ARN (APTÁMERO)	GGCCGGGUUAGGGCUAGAAAGUCGGCCGGCC	197-B2-006-31a
235	D-ARN (APTÁMERO)	CGCCGGGUUAGGGCUAGAAAGUCGGCCGGCG	197-B2-006-31b
236	D-ARN (APTÁMERO)	CGUGGUCCGUUGUGUCAGGUUCUJAUUCGCCCGGUGCAGGGCAUCCGCG	194-A2-001
236	D-ARN (APTÁMERO)	GCAGUGUGACGCGGACGUGAUAGGACAGAGCUGAUCCCGCUCAGGUGAG	196-B12-003
238	D-ARN (APTÁMERO)	CAACAGCAGUGUGACGCGGACGUGAUAGGACAGCUGAUCCCGCUCAG	196-B12-004
239	L-ARN (Spiegelmero)	5'-PEG-JAAGGAAACUCGGUCUGAUGCGGUAGCGCUGUGCAGAGCU	Spiegelmero Control PEGilado
240	L-ARN (SPIEGELMERO)	5'-30 kDa-PEG-GCGUGGUGUGAUCUAGAUGUAUUGGCUGAUCUAGUCAGGUACGC	NOX-A12-NO30
241	L-ARN (SPIEGELMERO)	5'-40 kDa-PEG-CGAUGGACUGAUCCUAGUCGGUUAUGUAUCUAGUGUGGUGCG	revNOX-A12-JE40

La presente invención se ilustra adicionalmente con las figuras, los ejemplos y la lista de secuencias a partir de las cuales pueden tomarse otras características, realizaciones y ventajas, en donde

- 5 Fig. 1: muestra un alineamiento de secuencias de ligandos de ARN relacionados que se unen a SDF-1 humana que indica el motivo de secuencia ("Tipo A") que, en una realización preferida, es completamente esencial para unirse a SDF-1 humana;
- Fig. 2A: muestra derivados del ligando de ARN 192-A10-001, (ligandos de ARN de SDF-1 humana con motivo de secuencia "Tipo A");
- Fig. 2B: muestra derivados del ligando de ARN 192-A10-001 (ligandos de ARN de SDF-1 humana con motivo de secuencia "Tipo A");
- 10 Fig. 3: muestra un alineamiento de secuencias de ligandos de ARN relacionados que se unen a SDF-1 humana que indica el motivo de secuencia ("Tipo B") que, en una realización preferida, es completamente esencial para unirse a SDF-1 humana;
- Fig. 4A: muestra derivados de ligandos de ARN 193-C2-001 y 193-G2-001 (ligandos de ARN de a SDF-1 humana con motivo de secuencia "Tipo B");
- 15 Fig. 4B: muestra derivados del ligando de ARN 193-C2-001 y 193-G2-001 (ligandos de ARN que se unen a SDF-1 humana con motivo de secuencia "Tipo B");
- Fig. 5: muestra un alineamiento de secuencias relacionados con los ligando de ARN que se unen a SDF-1 que indican la secuencia motivo "Tipo C" que es una realización preferida que es completamente esencial para unirse a SDF-1 humana;
- 20 Fig. 6: muestra derivados del ligando de ARN 190-A3-001 (ligandos de ARN de SDF-1 humana con motivo de secuencia "Tipo C");
- Fig. 7A: muestra derivados del ligando de ARN 190-D5-001 (ligandos de ARN de SDF-1 humana con motivo de secuencia "Tipo C");
- 25 Fig. 7B: muestra derivados del ligando de ARN 190-D5-001 (ligandos de ARN de SDF-1 humana con motivo de secuencia "Tipo C");
- Fig. 8: muestra derivados del ligando de ARN 197-B2 (ligandos de ARN de SDF-1 humana con motivo de secuencia "Tipo C");
- Fig. 9: muestra otros ligandos de ARN que se unen a la SDF-1 humana;
- 30 Fig. 10: muestra la quimiotaxis inducida por SDF-1 humana de células de leucemia de células T humanas de Jurkat, en la que, después de 3 horas de migración de las células de leucemia de células T humanas de Jurkat hacia diversas concentraciones de SDF-1 humana, se obtiene una curva de dosis-respuesta para la SDF-1 humana, y se representa como una señal de fluorescencia frente a la concentración de SDF-1 humana;
- Fig. 11: muestra el resultado de un análisis de unión del aptámero de unión a la SDF-1 humana 192-A10-001 a la D-SDF-1 humana biotinilada a 37 °C, representado como la unión del aptámero frente a la concentración de D-SDF-1 humana biotinilada;
- 35 Fig. 12: muestra la eficacia del Spiegelmero de unión a la SDF-1 humana 192-A10-001 en un ensayo de quimiotaxis; las células se dejaron migrar hacia SDF-1 humana 0,3 nM preincubada a 37 °C con diversas cantidades del Spiegelmero 192-A10-001, y se representa como el porcentaje de control frente a la concentración del Spiegelmero 192-A10-001;
- 40 Fig. 13: muestra el resultado de un análisis de unión competitiva de los aptámeros de unión a la SDF-1 humana 192-A10-001, 192-F10-001, 192-C9-001, 192-E10-001, 192-C10-001, 192-D11-001, 192-G11-001, 192-H11-001, 192-D10-001, 192-E9-001 y 192-H9-001 a la D-SDF-1 humana biotinilada a 37 °C, y se representa como la unión del aptámero marcado 192-A10-001 (empleado como referencia que es desplazado por los aptámeros no marcados) a 1 nM y 5 nM de los aptámeros no marcados 192-A10-001, 192-F10-001, 192-C9-001, 192-E10-001, 192-C10-001, 192-D11-001, 192-G11-001, 192-H11-001, 192-D10-001, 192-E9-001 y 192-H9-001;
- 45 Fig. 14: muestra el resultado de un análisis de unión del aptámero de unión a la SDF-1 humana 192-A10-008 a la D-SDF-1 humana biotinilada a 37 °C, y se representa como la unión del aptámero frente a la concentración de D-SDF-1 humana biotinilada;
- 50 Fig. 15: muestra un sensograma Biacore 2000 que indica el valor de  $K_D$  del Spiegelmero de unión a SDF-1 humana 192-A10-008 que se une a la SDF-1 humana que ha sido inmovilizada sobre un chip detector PioneerF1 mediante un procedimiento de acoplamiento de amina, y se representa como la respuesta (RU) frente al tiempo, y también se

enumeran las constantes de activación ( $K_{on}$ ) y de desactivación ( $K_{off}$ ) y los valores de  $K_D$  de los Spiegelmeros 192-A10-008 y 192-A10-001;

5 Fig. 16: muestra la eficacia del Spiegelmero de unión a la SDF-1 192-A10-008 en un ensayo de quimiotaxis; las células se dejaron migrar hacia SDF-1 humana 0,3 nM preincubada a 37 °C con diversas cantidades del Spiegelmero 192-A10-008, y se representa como el porcentaje de control frente a la concentración del Spiegelmero 192-A10-008;

10 Fig. 17: muestra un sensograma Biacore 2000 que indica el valor de  $K_D$  del Spiegelmero 193-G2-01 que se une a la SDF-1 humana que ha sido inmovilizada sobre un chip detector PioneerF1 mediante un procedimiento de acoplamiento de amina, y se representa como la respuesta (RU) frente al tiempo, y también se enumeran las constantes de activación y de desactivación y los valores de  $K_D$  de los Spiegelmeros 193-G2-001 y 193-C2-001;

Fig. 18: muestra el resultado de un análisis de unión del aptámero de unión a la SDF-1 humana 193-G2-012 a la D-SDF-1 humana biotinilada a 37 °C, y se representa como la unión del aptámero frente a la concentración de D-SDF-1 humana biotinilada;

15 Fig. 19: muestra el resultado de un análisis de unión competitiva de los aptámeros de unión a la SDF-1 humana 190-A3-001, 190-A3-003, 190-A3-004, 190-A3-007, 191-D5-001, 191-D5-002, 191-D5-003, 191-D5-004, 191-D5-005, 191-D5-006 y 191-D5-007 a la D-SDF-1 humana biotinilada a 37 °C, y se representa como la unión del aptámero marcado 190-A3-001 o 191-D5-001 (empleado como referencia que es desplazado por los aptámeros no marcados) a 500 nM, 50 nM y 10 nM de los aptámeros no marcados 190-A3-001, 190-A3-003, 190-A3-004, 190-A3-007, 191-D5-001, 191-D5-002, 191-D5-003, 191-D5-004, 191-D5-005, 191-D5-006 y 191-D5-007;

20 Fig. 20: muestra el resultado de un análisis de unión de los aptámeros de unión a la SDF-1 humana 190-A3-004 y 191-D5-007 a la D-SDF-1 humana biotinilada a 37 °C, y se representa como la unión del aptámero frente a la concentración de D-SDF-1 humana biotinilada;

25 Fig. 21: muestra un sensograma Biacore 2000 que indica el valor de  $K_D$  del Spiegelmero 191-D5-007 que se une a la SDF-1 humana que ha sido inmovilizada sobre un chip detector PioneerF1 mediante un procedimiento de acoplamiento de amina, y se representa como la respuesta (RU) frente al tiempo, y también se enumeran las constantes de activación y de desactivación y los valores de  $K_D$  de los Spiegelmeros 191-D5-001, 191-D5-007, 190-A3-003 y 197-B2;

30 Fig. 22: muestra la eficacia del Spiegelmero de unión a la SDF-1 190-A3-004 en un ensayo de quimiotaxis; las células se dejaron migrar hacia SDF-1 humana 0,3 nM preincubada a 37 °C con diversas cantidades del Spiegelmero 190-A3-004, y se representa como el porcentaje del control frente a la concentración del Spiegelmero 190-A3-004;

35 Fig 23A: muestra la eficacia de los Spiegelmeros de unión a la SDF-1 193-G2-012-5'-PEG, 197-B2-006-5'-PEG, 191-D5-007-5'-PEG y 191-A10-008-5'-PEG en un ensayo de quimiotaxis; las células se dejaron migrar hacia SDF-1 humana 0,3 nM preincubada a 37°C con diversas cantidades de los Spiegelmeros 193-G2-012-5'-PEG, 197-B2-006-5'-PEG, 191-D5-007-5'-PEG y 191-A10-008-5'-PEG, y se representa como el porcentaje del control frente a la concentración de los Spiegelmeros 193-G2-012-5'-PEG, 197-B2-006-5'-PEG, 191-D5-007-5'-PEG y 191-A10-008-5'-PEG;

40 Fig. 23B: muestra la eficacia de los Spiegelmeros de unión a la SDF-1 197-B2-006-5'-PEG y 197-B2-006-31b-5'-PEG en un ensayo de quimiotaxis; las células se dejaron migrar hacia SDF-1 humana 0,3 nM preincubada a 37 °C con diversas cantidades de los Spiegelmeros 197-B2-006-5'-PEG y 197-B2-006-31b-5'-PEG, y se representa como el porcentaje del control frente a la concentración de los Spiegelmeros 197-B2-006-5'-PEG y 197-B2-006-31b-5'-PEG;

45 Fig. 24A: muestra un sensograma Biacore 2000 que indica el valor de  $K_D$  de los Spiegelmeros 193-G2-012-5'-PEG, 191-A10-008-5'-PEG y 191-A10-001-5'-PEG que se unen a la SDF-1 humana que ha sido inmovilizada sobre un chip detector PioneerF1 mediante un procedimiento de acoplamiento de amina, y se representa como la respuesta (RU) frente al tiempo;

50 Fig. 24B: muestra un sensograma Biacore 2000 que indica el valor de  $K_D$  de los Spiegelmeros 197-B2-006-5'-PEG, 197-B2-006-31b-5'-PEG y 191-D5-007-5'-PEG que se unen a la SDF-1 humana que ha sido inmovilizada sobre un chip detector PioneerF1 mediante un procedimiento de acoplamiento de amina, y se representa como la respuesta (RU) frente al tiempo;

55 Fig. 25A: muestra la eficacia de los Spiegelmeros de unión a la SDF-1 192-A10-001, 192-A10-001-5'-HES130 y 192-A10-001-5'-HES100 en un ensayo de quimiotaxis; las células se dejaron migrar hacia SDF-1 humana 0,3 nM preincubada a 37°C con diversas cantidades de los Spiegelmeros 192-A10-001, 192-A10-001-5'-HES130 y 192-A10-001-5'-HES100, y se representa como el porcentaje del control frente a la concentración de los Spiegelmeros 192-A10-001, 192-A10-001-5'-HES130 y 192-A10-001-5'-HES100;

- 5 Fig. 25B: muestra la eficacia de los Spiegelmeros de unión a la SDF-1 192-A10-001, 192-A10-001-5'-PEG30 y 192-A10-001-5'-PEG40 en un ensayo de quimiotaxis; las células se dejaron migrar hacia SDF-1 humana 0,3 nM preincubada a 37 °C con diversas cantidades de los Spiegelmeros 192-A10-001, 192-A10-001-5'-PEG30 y 192-A10-001-5'-PEG40, y se representa como el porcentaje del control frente a la concentración de los Spiegelmeros 192-A10-001, 192-A10-001-5'-PEG30 y 192-A10-001-5'-PEG40;
- Fig. 26: muestra la ineficacia de un Spiegelmero control en un ensayo de quimiotaxis; las células se dejaron migrar hacia SDF-1 humana o murina 0,3 nM preincubada a 37 °C con diversas cantidades de Spiegelmero control, y se representa como el porcentaje del control frente a la concentración del Spiegelmero control;
- 10 Fig. 27: muestra la quimiotaxis inducida por SDF-1 murina de células de leucemia de células T humanas de Jurkat, en la que, después de 3 horas de migración de las células de leucemia de células T humanas de Jurkat hacia diversas concentraciones de SDF-1, se obtiene una curva de dosis-respuesta para la SDF-1, y se representa como una señal de fluorescencia;
- 15 Fig. 28: muestra la eficacia de los Spiegelmeros de unión a la SDF-1 192-A10-001 y 191-D5-007-5'-PEG en un ensayo de quimiotaxis; las células se dejaron migrar hacia SDF-1 murina 0,3 nM preincubada a 37 °C con diversas cantidades de los Spiegelmeros 192-A10-001 y 191-D5-007-5'-PEG, y se representa como el porcentaje del control frente a la concentración de los Spiegelmeros 192-A10-001 y 191-D5-007-5'-PEG;
- 20 Fig. 29: muestra la eficacia del Spiegelmero de unión a la SDF-1 192-A10-001 en un ensayo de unión al receptor CXCR4 empleando [<sup>125</sup>J]-SDF-1α que había sido preincubada a 37 °C con diversas cantidades del Spiegelmero 192-A10-001, y la [<sup>125</sup>J]-SDF-1α unida específicamente se representó frente a la concentración del Spiegelmero 192-A10-001; y
- Fig. 30: muestra la inhibición de la estimulación de MAP-quinasa de células que expresan CXCR4 con SDF-1α humana 1 nM mediante el Spiegelmero de unión a SDF-1 humana 192-A10-001;
- 25 Fig. 31: muestra la inhibición de la germinación inducida por SDF-1 por el Spiegelmero de unión a SDF-1 humana 193-G2-012-5'-PEG y por un Spiegelmero control PEGilado en un ensayo de germinación del anillo aórtico, en el que anillos de aorta de rata se incorporan en una matriz de colágeno y se incuban durante 6 días con SDF-1 con o sin Spiegelmeros (a: control; b: SDF-1 10 nM; c: SDF-1 10 nM + Spiegelmero de unión a SDF-1 humana 193-G2-012-5'-PEG 1 μM; d: SDF-1 10 nM + Spiegelmero control PEGilado 1 μM);
- 30 Fig. 32: muestra la inhibición de la germinación inducida por SDF-1 por el Spiegelmero de unión a SDF-1 humana 193-G2-012-5'-PEG y por un Spiegelmero control PEGilado en un ensayo de germinación del anillo aórtico, en el que los índices de germinación se muestran como promedio +/- DE (desviación estándar) para 5 anillos por condición (\*: el valor de SDF-1 es significativamente diferente del control (ensayo de Mann-Whitney; p= 0,009); \*\*: el valor para SDF-1 + Spiegelmero de unión a SDF-1 humana 193-G2-012-5'-PEG es significativamente diferente del valor para SDF-1 (ensayo de Mann-Whitney; p= 0,028);
- 35 Fig. 33: muestra una representación esquemática de un tratamiento animal y métodos aplicados para generar datos de liberación de células madre según el Ejemplo 10;
- Fig. 34: muestra el número absoluto de células CD117+ y Ly-6 A/E+ (células madre hematopoyéticas/células progenitoras hematopoyéticas) por microlitro de plasma liberado después de 1 a 48 horas después de una inyección de NOX-A12-JE40, NOX-A12-NO30, revNOX-A12-JE40 (Spiegelmero control), AMD3100, G-CSF (Neupogen) o vehículo (glucosa 5%); las gráficas muestran valores medios y desviación estándar;
- 40 Fig. 35: muestra las unidades formadoras de colonias por μL de sangre de ratones C57BL/6 después de 6 horas para derivados de NOX-A12, y AMD3100, o 48 horas después para G-CSF (Neupogen) y la inyección del vehículo como se indica en la leyenda; el diagrama muestra los valores de la media y la desviación estándar de 5 ratones (cada uno por triplicado);
- 45 Fig. 36: muestra los resultados de un estudio de neovascularización coroidea inducida por láser en ratones, en la que NOX-A12-JE40 reduce el área de neovascularización en el ojo tratado con NOX-A12-JE40 en comparación directa con el área en el ojo tratado con el vehículo (disolución de Ringer) del mismo animal (diagrama izquierdo); las áreas neovasculares medias de las lesiones individuales en los ojos de ratones tratados con NOX-A12-JE40 y el vehículo después de la lesión por láser se muestran en el diagrama de la derecha;
- 50 Fig. 37: muestra los resultados del tratamiento repetido en ratones sanos y ratones diabéticos y sin uninefrectomía con el vehículo, NOX-A12-JE40, revNOX-A12-JE40 (Spiegelmero control) en el que NOX-A12-JE40 mejora las puntuaciones de glomerulosclerosis;
- 55 Fig. 38: muestra los resultados de un modelo animal para filtración vascular retiniana después de la inducción por VEGF administrada intravítreamente de los animales con diferentes concentraciones del Spiegelmero de unión a SDF-1 NOX-A12-JE40, el vehículo o Kenacort retard; en este modelo, la permeabilidad de la vasculatura retiniana se midió mediante fotometría de fluorescencia 48 horas después de la inyección intravítrea de VEGF;

Fig. 39: muestra las puntuaciones de retinopatía (ojo tratado con el vehículo [eje-x] frente al ojo tratado con Spiegelmero NOX-A12-JE40 [eje-y]) de ratones individuales en un modelo murino de retinopatía inducida por oxígeno que es un modelo para imitar la neovascularización de la retina inducida por hipoxia, como se observa en retinopatía diabética o DMRE;

5 Fig. 40: muestra los p valores para las diferencias estadísticas entre el ojo tratado con el Spiegelmero NOX-A12-JE40 y el vehículo para los parámetros medidos individualmente de la retinopatía y de la puntuación de la retinopatía como medida en el modelo murino de retinopatía inducida por oxígeno que es el modelo para imitar la neovascularización de la retina inducida por hipoxia, como se observa en retinopatía diabética o DMRE; los valores p se determinaron empleando el ensayo de clasificación de Wilcoxon;

10 Fig. 41: muestra el recuento de células sanguíneas blancas después de la administración intravenosa de 13,4 mg de ácido nucleico NOX-A12-JE40 de unión a SDF-1 (calculado en relación a la parte de oligo), en el que se registró sólo un punto de tiempo después de la administración del vehículo (glucosa 5%) ya que se asume que es constante; sin embargo, NOX-A12-JE40 moviliza una cantidad razonable de células blancas sanguíneas de una manera reversible;

15 Fig. 42: muestra un resumen de indicaciones para trasplantes de células madre hematopoyéticas alogénicas (abreviado HSCT, de sus siglas en inglés) y el número de pacientes en Europa (Gratwohl, Baldomero et al., 2002);

Fig. 43: muestra un resumen de indicaciones para trasplantes de células madre hematopoyéticas autólogas (abreviado HSCT) y el número de pacientes en Europa (Gratwohl, Baldomero et al., 2002).

### Ejemplos

Ejemplo 1: Ácidos nucleicos que se unen a SDF-1 humana

20 Empleando la D-SDF-1 humana biotinilada como diana, pueden generarse varios ácidos nucleicos que se unen a la SDF-1 humana, cuyas secuencias de nucleótidos se muestran en las Figuras 1 a 9. Los ácidos nucleicos se caracterizaron con el aptámero, es decir, al nivel de ácido nucleico-D con la D-SDF-1 humana biotinilada o al nivel de Spiegelmero, es decir, el ácido nucleico-L con la configuración natural de la SDF-1 (L-SDF-1).

25 Los aptámeros se analizaron con la D-SDF-1 humana biotinilada empleando ensayos de unión pull-down directos o competitivos con D-SDF-1 humana biotinilada (Ejemplo 4). Los Spiegelmeros se ensayaron con la configuración natural de la SDF-1 (L-SDF-1) mediante una medición de resonancia de plasmón de superficie empleando un instrumento Biacore 2000 (Ejemplo 6) y un ensayo de quimiotaxis de cultivo celular in vitro (Ejemplo 5).

30 Las moléculas de ácidos nucleicos generadas de este modo muestran diferentes motivos de secuencia y se definen tres tipos principales en las Figuras 1, 2A y 2B (Tipo A), Figuras 3, 4A y 4B (Tipo B), Figuras 5, 6, 7A, 7B y 8 (Tipo C). Para la definición de los motivos de secuencias de nucleótidos se emplearon las abreviaturas de la IUPAC para nucleótidos ambiguos:

S	fuerte	G o C;
W	débil	A o U;
R	purina	G o A;
Y	pirimidina	C o U;
K	ceto	G o U,
M	imino	A o C;
B	no A	C o U o G;
D	no C	A o G o U;
H	no G	A o C o U;
V	no U	A o C o G;
N	todos	A o G o C o U

Si no se indica lo contrario, cualquier secuencia de ácido nucleico o secuencia de tramos y cajas, respectivamente, se indica en la dirección 5' → 3'.

#### 1.1 Ácidos nucleicos de unión a SDF-1 de tipo A

Como se muestra en la Figura 1, todas las secuencias de los ácidos nucleicos de unión a SDF-1 de Tipo A comprenden una secuencia de nucleótidos central que está flanqueada por tramos 5'- y 3'-terminales que pueden hibridarse entre sí. Sin embargo, esta hibridación no se produce necesariamente en la molécula.

- 5 Los ácidos nucleicos se caracterizaron al nivel del aptámero empleando ensayos de pull-down competitivos y directos con D-SDF-1 humana biotinilada para clasificarlos con respecto a su comportamiento de unión (Ejemplo 4). Las secuencias seleccionadas se sintetizaron como Spiegelmeros (Ejemplo 3) y se ensayaron empleando la configuración natural de la SDF-1 (L-SDF) en un ensayo de quimiotaxis de cultivo celular in vitro (Ejemplo 5) y mediante una medición de resonancia de plasmón de superficie empleando un instrumento Biacore 2000 (Ejemplo 6).
- 10 Las secuencias de las cajas o tramos definidos pueden ser diferentes entre los ácidos nucleicos de unión a SDF-1 de Tipo A, lo cual influye en la afinidad de unión con la SDF-1. Basándose en el análisis de la unión de los diferentes ácidos nucleicos de unión a SDF-1, resumidos como ácidos nucleicos de unión a SDF-1 de tipo A, la secuencia de nucleótidos central y sus secuencias de nucleótidos, tal como se describen a continuación, son individuales y más preferiblemente fundamentales en su totalidad para la unión a SDF-1:
- 15 La secuencia de nucleótidos central de todas las secuencias identificadas de los ácidos nucleicos de unión a SDF-1 de tipo A comparten la secuencia AAAGYRACAHGUMAAX<sub>A</sub>UGAAAGGUARC (Fórmula 1 de Tipo A), en la que X<sub>A</sub> está ausente o es 'A'. Si 'A' está ausente, la secuencia de nucleótidos central puede resumirse como Fórmula 2 de Tipo A (AAAGYRACAHGMAAUGAAAGGUARC). El ácido nucleico de unión a SDF-1 de Tipo A 191-A6 (secuencia de nucleótidos central: AAAGU AACACG UAAAAUGAAAGGUAAC) que porta el nucleótido adicional 'A' dentro de la
- 20 secuencia de nucleótidos central y que sigue uniéndose a la SDF-1 permite considerar una secuencia de nucleótidos central alternativa (AAAGYRACAHGUMAAAUGAAAGGUARC, Fórmula 3 de Tipo A). Como ejemplo de todos los demás ácidos nucleicos de los ácidos nucleicos de unión a SDF-1 de Tipo A, se caracterizó el ácido nucleico de unión a SDF-1 de Tipo A 192-A10-001 por su afinidad de unión a la SDF-1 humana. La constante de unión en equilibrio K<sub>D</sub> se determinó empleando el ensayo de unión de pull-down (K<sub>D</sub> = 1,5 nM, Fig. 11) y mediante una
- 25 medición de resonancia de plasmón de superficie (K<sub>D</sub> = 1,0 nM, Fig. 15). Se midió una IC<sub>50</sub> (concentración inhibidora del 50%) de 0,12 nM para 192-A10-001 empleando un ensayo de quimiotaxis de cultivo celular in vitro (Fig. 12). Por consiguiente, todos los ácidos nucleicos de unión a SDF-1 de Tipo A, según se muestra en la Figura 1, se analizaron en un ensayo de unión de pull-down competitivo frente a 192-A10-001 (Figura 13; no todos los ácidos nucleicos de unión a SDF-1 de Tipo A ensayados se muestran en la Fig. 13). Los ácidos nucleicos de unión a SDF-1 de tipo A 192-B11 y 192-C10 muestran unas afinidades de unión iguales a la de 192-A10-001 en estos experimentos de
- 30 competición. Se determinó una afinidad de unión más débil para los ácidos nucleicos de unión a SDF-1 de tipo A 192-G10, 192-F10, 192-C9, 192-E10, 192-D11, 192-G11, 192-H11 y 191-A6. Los ácidos nucleicos de unión a SDF-1 de tipo A 192-D10, 192-E9 y 192-H9 tienen una afinidad de unión mucho más débil que 192-A10-001 (Fig. 13).

35 Como se mencionó anteriormente, los ácidos nucleicos de unión a SDF-1 de Tipo A 192-B11 y 192-C10 muestran una afinidad de unión a la SDF-1 igual que la de 192-A10-001. Sin embargo, muestran ligeras diferencias en la secuencia de nucleótidos de la secuencia de nucleótidos central. Por lo tanto, la secuencia consenso de las tres moléculas de unión a SDF-1 con casi la misma afinidad alta puede resumirse mediante la secuencia de nucleótidos AAAGYAACA HGUCA AUGAAAGGUARC (Fórmula 4 de Tipo A)

40 en la que la secuencia de nucleótidos de la secuencia de nucleótidos central de 192-A10-001 (secuencia de nucleótidos: AAAGCAACAUGUCA AUGAAAGGUAGC) representa la secuencia de nucleótidos con la mejor afinidad de unión de los ácidos nucleicos de unión a SDF-1 de Tipo A.

45 Cinco o seis de los seis nucleótidos del tramo 5'-terminal de los ácidos nucleicos de unión a SDF-1 de Tipo A pueden hibridarse con los respectivos cinco o seis nucleótidos de los seis nucleótidos del tramo 3'-terminal de los ácidos nucleicos de unión a SDF-1 de Tipo A para formar una hélice terminal. Aunque estos nucleótidos son variables en varias posiciones, los diferentes nucleótidos permiten la hibridación de cinco o seis de los seis nucleótidos de cada uno de los tramos 5'- y 3'-terminales. Los tramos 5'-terminal y 3'-terminal de los ácidos nucleicos de unión a SDF-1 de Tipo A, como se muestran en la Figura 1, pueden resumirse con una fórmula genérica para el

50 tramo 5'-terminal ('RSHRYR', Fórmula 5-5' de Tipo A) y para el tramo 3'-terminal ('YRYDSY', Fórmula 5-3' de Tipo A). Los derivados truncados del ácido nucleico de unión a SDF-1 de Tipo A 192-A10-001 se analizaron en un ensayo de unión de pull-down competitivo frente a la molécula original 192-A10-001 y 192-A10-008 (Fig. 2A y 2B). Estos experimentos demuestran que una reducción de los seis nucleótidos terminales (extremo 5': GCUGUG; extremo 3': CGCAGC) de 192-A10-001 a cinco nucleótidos (extremo 5': CUGUG; extremo 3': CGCAG) del derivado 192-A10-002 pueden realizarse sin que se produzca una reducción de la afinidad de unión. Sin embargo, el truncado a cuatro

55 nucleótidos terminales (extremo 5': UGUG; extremo 3': CGCA; 192-A10-003) o menos (192-A10-004/ -005/ -006/ -007), conduce a una afinidad de unión por SDF-1 reducida (Fig. 2A). Los tramos terminales 5'-terminal y 3'-terminal y 3' determinados con una longitud de cinco y cuatro nucleótidos de los derivados del ácido nucleico de unión a SDF-1 de Tipo A 192-A10-001, como se muestran en las Figs. 2A y B, pueden describirse con una fórmula genérica para el tramo 5'-terminal ('X<sub>2</sub>BBBS', Fórmula 6-5' de Tipo A) y para el tramo 3'-terminal ('SBBVX<sub>3</sub>', Fórmula 6-3' de Tipo A), en la que X<sub>2</sub> está ausente o es 'S', y X<sub>3</sub> está ausente o es 'S'.

La secuencia de nucleótidos de los tramos 5'-y 3'-terminales influye en la afinidad de unión de los ácidos nucleicos de unión a SDF-1 de Tipo A. Esto no sólo lo demuestran los ácidos nucleicos 192-F10 y 192-E10, sino también los derivados de 192-A10-001 (Fig. 2B). Las secuencias de nucleótidos centrales de 192-F10 y 192-E10 son idénticas a 192-B11 y 192-C10, pero comprenden ligeras diferencias en el extremo 3' del tramo 5'-terminal y en el extremo 5' del tramo 3'-terminal que resultan en una afinidad de unión reducida.

La sustitución de los nucleótidos 5'-y 3'-terminales 'CUGUG' y 'CGCAG' del ácido nucleico de unión a SDF-1 de Tipo A 192-A10-002 por 'GCGCG' y 'CGCGC' (192-A10-015) produjo una afinidad de unión reducida, mientras que las sustituciones por 'GCGUG' y 'CGCGC' (192-A10-008) dieron como resultado la misma afinidad de unión como la que muestra para 192-A10-002 (Fig. 2B, Fig. 15, Fig. 12, Fig. 16).

Además, nueve derivados del ácido nucleico de unión a SDF-1 de Tipo A 192-A10-001 (192-A10-014/ -015/ -016/ -017/ -018/ -019/ -020/ -021/ -022/ -023) que portan cuatro nucleótidos 5' y 3'-terminales, respectivamente, se ensayaron como aptámeros para su afinidad de unión frente a 192-A10-001 o a su derivado 192-A10-008 (ambos tienen idéntica afinidad de unión con SDF-1). Todos los clones mostraron una afinidad de unión más débil, muy débil o mucho más débil por SDF-1 que 192-A10-001 (seis nucleótidos que forman una hélice terminal) o que 192-A10-008 con cinco nucleótidos terminales, respectivamente (Fig. 2B). Por consiguiente, la secuencia y el número de nucleótidos de los tramos 5'-y 3'-terminales son fundamentales para una unión eficaz a SDF-1. Como se demuestra para los ácidos nucleicos de unión a SDF-1 de Tipo A 192-A10-002 y 192-A10-008, la combinación preferida de tramos 5'- y 3'-terminales son 'CUGUG' y 'CGCAG' (tramos 5'- y 3'-terminales del ácido nucleico de unión a SDF-1 de tipo A 192-A10-002) y 'GCGUG' y 'CGCGC' (tramos 5'- y 3'- terminales del ácido nucleico de unión a SDF-1 de Tipo A 192-A10-008).

Sin embargo, combinando los tramos 5'- y 3'-terminales de todos los ácidos nucleicos de unión a SDF-1 de Tipo A ensayados, la fórmula genérica para el tramo 5'- terminal de los ácidos nucleicos de unión a SDF-1 de Tipo A es 'X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>NNBV' (Fórmula 7-5' de Tipo A) y la fórmula genérica para el tramo 3'-terminal de los ácidos nucleicos de unión a SDF-1 de Tipo A es 'BNBNX<sub>3</sub>X<sub>4</sub>' (fórmula 7-3' de tipo A), en las que

X<sub>1</sub> es 'R' o está ausente, X<sub>2</sub> es 'S', X<sub>3</sub> es 'S', y X<sub>4</sub> es 'Y' o está ausente;

o

X<sub>1</sub> está ausente, X<sub>2</sub> es 'S' o está ausente, X<sub>3</sub> es 'S' o está ausente, y X<sub>4</sub> está ausente.

## 1.2 Ácidos nucleicos de unión a SDF-1 de Tipo B

Como se muestra en la Fig. 3, todas las secuencias de los ácidos nucleicos de unión a SDF-1 de Tipo B comprenden una secuencia de nucleótidos central que está flanqueada por tramos 5'- y 3'-terminales que pueden hibridarse entre sí. Sin embargo, tal hibridación no se produce necesariamente en la molécula.

Los ácidos nucleicos se caracterizaron al nivel del aptámero empleando ensayos de pull-down competitivos y directos con D-SDF-1 humana biotinilada para clasificarlos con respecto a su comportamiento de unión (Ejemplo 4). Las secuencias seleccionadas se sintetizaron como Spiegelmeros (Ejemplo 3) y se ensayaron empleando la configuración natural de la SDF-1 (L-SDF) en un ensayo de quimiotaxis de cultivo celular in vitro (Ejemplo 5) y mediante una medición de resonancia de plasmón de superficie empleando un instrumento Biacore 2000 (Ejemplo 6).

Las secuencias de las cajas o tramos definidos pueden ser diferentes entre los ácidos nucleicos de unión a SDF-1 de Tipo B, lo cual influye en la afinidad de unión con la SDF-1. Basándose en el análisis de la unión de los diferentes ácidos nucleicos de unión a SDF-1, resumidos como ácidos nucleicos de unión a SDF-1 de Tipo B, la secuencia de nucleótidos central y sus secuencias de nucleótidos, como se describen a continuación, son individuales y más preferiblemente fundamentales en su totalidad para la unión a SDF-1:

La secuencia de nucleótidos central de todas las secuencias identificadas de los ácidos nucleicos de unión a SDF-1 de Tipo B comparten la secuencia: GUGUGAUCUAGAUGUADWGGCUGWUCCUAGUYAGG (Fórmula 1 de Tipo B). Los ácidos nucleicos de unión a SDF-1 de Tipo B 193-G2-001, 193-C2-001 y 193-F2-001, que se diferencian en una posición en la secuencia de nucleótidos central, se analizaron en un ensayo de unión de pull-down competitivo frente al ácido nucleico de unión a SDF-1 de Tipo A 192-A10-001 (K<sub>D</sub> de 1,5 nM determinada en un ensayo de unión de pull-down [Fig. 11], K<sub>D</sub> de 1,0 nM determinado mediante una medición de resonancia de plasmón de superficie [Fig. 15], IC<sub>50</sub> de 0,12 nM; [Fig. 12]). Cada uno de los tres ácidos nucleicos de unión a SDF-1 de Tipo B ensayados muestra una mejor unión a la SDF-1 humana en comparación con el ácido nucleico de unión a SDF-1 de Tipo A 192-A10-001, siendo la afinidad de unión de 193-G2-001 tan buena como la de 193-C2-001 y 193-F2-001 (Fig. 3). Los datos sugieren que la diferencia en la secuencia de nucleótidos de la secuencia de nucleótidos central de los ácidos nucleicos de unión a SDF-1 de Tipo B 193-G2-001, 193-C2-001 y 193-F2-001 no influye en la afinidad de unión con SDF-1. Como ejemplo, el ácido nucleico de unión a SDF-1 de Tipo B 193-G2-001 se caracterizó para su afinidad de unión a la SDF-1 humana. La constante de unión en equilibrio K<sub>D</sub> se determinó empleando el ensayo de unión de pull-down (K<sub>D</sub> = 0,3 nM) y mediante una medición de resonancia de plasmón de superficie (K<sub>D</sub> = 0,5 nM, Fig. 17). Se midió una IC<sub>50</sub> (concentración inhibidora del 50%) de 0,08 nM para 193-G2-001 empleando un ensayo de

quimiotaxis de cultivo celular in vitro. Por el contrario, los ácidos nucleicos de unión a SDF-1 de Tipo B 193-B3-002, 193-H3-002, 193-E3-002 y 193-D1-002, que se diferencian en la secuencia de la secuencia de nucleótidos central, muestran peores propiedades de unión (Fig. 3). Como resultado, los ácidos nucleicos de unión a SDF-1 de Tipo B con una mejor afinidad de unión con SDF-1 comparten una secuencia de nucleótidos central con la secuencia:

5 GUGUGAUCUAGAUGUADUGGCUGAUCUAGUCAGG (Fórmula 2 de Tipo B).

Cuatro, cinco o seis nucleótidos de los seis nucleótidos del tramo 5'-terminal de los ácidos nucleicos de unión a SDF-1 de Tipo B pueden hibridarse con los respectivos cuatro, cinco o seis nucleótidos de los seis nucleótidos del tramo 3'-terminal de los ácidos nucleicos de unión a SDF-1 de Tipo B para formar una hélice terminal.

Aunque estos nucleótidos son variables en varias posiciones, los diferentes nucleótidos permiten la hibridación de cuatro, cinco o seis de los seis nucleótidos de cada uno de los tramos 5'-y 3'-terminales. Los tramos 5'-terminal y 3'-terminal de los ácidos nucleicos de unión a SDF-1 de Tipo B, como se muestran en la Fig. 3, pueden resumirse con una fórmula genérica para el tramo 5'-terminal (Fórmula 3-5' de Tipo B; 'X<sub>1</sub>GCRWG', en la que X<sub>1</sub> es 'A' o está ausente) y para el tramo 3'-terminal (Fórmula 3-3' de Tipo B; 'KRYSCX<sub>4</sub>', en la que X<sub>4</sub> es 'U' o está ausente). Los ácidos nucleicos de unión a SDF-1 de Tipo B 193-G1-002, 193-D2-002, 193-A1-002 y 193-D3-002 presentan unas afinidades de unión más débiles por SDF-1, aunque comparten una secuencia de nucleótidos central idéntica (Fórmula 2 de Tipo B) con 193-C2-001, 193-G2-001 y 193-F2-001 (Fig. 3). Las propiedades de unión desfavorables de los ácidos nucleicos de unión a SDF-1 de Tipo B 193-G1-002, 193-D2-002, 193-A1-002 y 193-D3-002 pueden ser debidas al número de nucleótidos y la secuencia de los tramos 5'- y 3'-terminales.

Los derivados truncados de los ácidos nucleicos de unión a SDF-1 de Tipo B 193-G2-001 y 193-C2-001 se analizaron en un ensayo de unión de pull-down competitivo frente a 193-G2-001 y 193-G2-012, respectivamente (Fig. 4A y 4B). Estos experimentos demuestran que una reducción de los seis nucleótidos terminales (extremo 5': AGCGUG; extremo 3': UACGCU) de los ácidos nucleicos de unión a SDF-1 de Tipo B 193-G2-001 y 193-C2-001 a cinco nucleótidos (extremo 5': GCGUG; extremo 3': UACGC) conducen a moléculas con una afinidad de unión similar (193-C2-002 y 193-G2-012). La constante de disociación en equilibrio K<sub>D</sub> se determinó empleando el ensayo de unión de pull-down (K<sub>D</sub> = 0,3 nM, Fig. 18). Un truncado a cuatro (extremo 5': CGUG; extremo 3': UACG; 193-C2-003) o menos nucleótidos (193-C2-004, 193-C2-005, 193-C2-006, 193-C2-007) da como resultado una afinidad de unión por SDF-1 reducida, que se mide empleando el ensayo de unión de pull-down de competición (Fig. 4A). La secuencia de nucleótidos de los cinco nucleótidos terminales en el extremo 5'- y 3', respectivamente, influye en la afinidad de unión de los ácidos nucleicos de unión a SDF-1 de Tipo B. La sustitución de los nucleótidos 5'- y 3'-terminales 'GCGUG' y 'UACGC' (193-C2-002, 193-G2-12) por 'GCGCG' y 'CGCGC' (193-G2-013) da como resultado una afinidad de unión reducida. Además, se ensayaron los cuatro derivados diferentes del ácido nucleico de unión a SDF-1 de Tipo B 193-G2-001 con una hélice terminal y con una longitud de cuatro nucleótidos con apareamiento de bases (193-G2-014/ -015/ -016/ -017). Todos mostraron una afinidad de unión reducida por la SDF-1 (Fig. 4B). Por lo tanto, la secuencia y la longitud de los nucleótidos 5'- y 3'-terminales son fundamentales para una unión eficaz con la SDF-1. Los tramos terminales 5'-terminal y 3'-terminal con una longitud de cinco y cuatro nucleótidos de los derivados de los ácidos nucleicos de unión a SDF-1 de Tipo B 193-C2-003 y 193-G2-012, como se muestran en las Figs. 4A y 4B, pueden describirse con una fórmula genérica para el tramo 5'-terminal ('X<sub>2</sub>SSBS', Fórmula 4-5' de Tipo B), en la que X<sub>2</sub> está ausente o es 'G', y para el tramo 3'-terminal ('BVSSX<sub>3</sub>', Fórmula 4-3' de Tipo B), en la que X<sub>3</sub> está ausente o es 'C'. Como se demuestra para los ácidos nucleicos de unión a SDF-1 de Tipo B 193-G2-001 y 193-C2-01 y sus derivados 193-G2-012 y 193-C2-002, la combinación preferida de tramos 5'- y 3'-terminales son 'X<sub>1</sub>GCGUG' (tramo 5'-terminal; Fórmula 5-5' de Tipo B) y 'UACGCX<sub>4</sub>' (tramo 3'-terminal; Fórmula 5-3' de Tipo B), en las que X<sub>1</sub> es 'A' o está ausente, y X<sub>4</sub> es 'U' o está ausente.

Sin embargo, combinando los tramos 5'- y 3'-terminales de todos los ácidos nucleicos de unión a SDF-1 de Tipo B ensayados, la fórmula genérica para el tramo 5'-terminal de los ácidos nucleicos de unión a SDF-1 de tipo B es 'X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>SVNS' (Fórmula 6-5' de Tipo B) y la fórmula genérica para el tramo 3'-terminal de los ácidos nucleicos de unión a SDF-1 de Tipo B es 'BVBSX<sub>3</sub>X<sub>4</sub>' (Fórmula 6-3' de Tipo B), en las que

X<sub>1</sub> es 'A' o está ausente, X<sub>2</sub> es 'G', X<sub>3</sub> es 'C', y X<sub>4</sub> es 'U' o está ausente; o X<sub>1</sub> está ausente, X<sub>2</sub> es 'G' o está ausente, X<sub>3</sub> es 'C' o está ausente, y X<sub>4</sub> está ausente.

### 1.3 Ácidos nucleicos de unión a SDF-1 de tipo C

Como se muestra en la Fig. 5, todas las secuencias de los ácidos nucleicos de unión a SDF-1 de Tipo C comprenden una secuencia de nucleótidos central que está flanqueada por tramos 5'- y 3'-terminales que pueden hibridarse entre sí. Sin embargo, tal hibridación no se produce necesariamente en la molécula.

Los ácidos nucleicos se caracterizaron al nivel del aptámero empleando ensayos de pull-down competitivos y directos con D-SDF-1 humana biotinilada para clasificarlos con respecto a su comportamiento de unión (Ejemplo 4). Las secuencias seleccionadas se sintetizaron como Spiegelmeros (Ejemplo 3) y se ensayaron empleando la configuración natural de la SDF-1 (L-SDF) en un ensayo de quimiotaxis de cultivo celular in vitro (Ejemplo 5) y mediante una medición de resonancia de plasmón de superficie empleando un instrumento Biacore 2000 (Ejemplo 6).

Las secuencias de las cajas o tramos definidos pueden ser diferentes entre los ácidos nucleicos de unión a SDF-1 de Tipo C, lo cual influye en la afinidad de unión con la SDF-1. Basándose en el análisis de la unión de los diferentes ácidos nucleicos de unión a SDF-1, resumidos como ácidos nucleicos de unión a SDF-1 de tipo C, la secuencia de nucleótidos central y sus secuencias de nucleótidos, tal como se describen a continuación, son individuales y más preferiblemente fundamentales en su totalidad para la unión a SDF-1:

La secuencia de nucleótidos central de todas las secuencias identificadas de los ácidos nucleicos de unión a SDF-1 de tipo C comparten la secuencia GGUYAGGGCUHRX<sub>A</sub>AGUCGG (Fórmula 1 de Tipo C), en la que X<sub>A</sub> está ausente o es 'A'. Con la excepción del ácido nucleico de unión a SDF-1 de Tipo C 197-D1, la secuencia de nucleótidos central de todas las secuencias identificadas de los ácidos nucleicos de unión a SDF-1 de Tipo C comparten la secuencia de nucleótidos GGUYAGGGCUHRAAGUCGG (Fórmula 2 de Tipo C). El ácido nucleico de unión a SDF-1 de Tipo C 197-D1 (secuencia de nucleótidos central: GGUUAGGGCUAA-AGUCGG), que carece de un nucleótido 'A' dentro de la secuencia de nucleótidos central y que sigue uniéndose a SDF-1, permite considerar una secuencia de nucleótidos central alternativa (GGYAGGGCUHR-AGUCGG), (Fórmula 3 de Tipo C). Inicialmente, todos los ácidos nucleicos de unión a SDF-1 de Tipo C, como se muestran en la Fig. 5, se analizaron en un ensayo de unión de pull-down competitivo frente al ácido nucleico de unión a SDF-1 de Tipo A 192-A10-001 ( $K_D = 1,5$  nM determinada en un ensayo de unión de pull-down y mediante una medición de resonancia de plasmón de superficie;  $IC_{50} = 0,12$  nM). Los ácidos nucleicos de unión a SDF-1 de Tipo C 191-D5-001, 197-B2, 190-A3-001, 197-H1, 197-H3 y 197-E3 mostraron unas afinidades de unión más débiles que 192-A10-001 en experimentos de competición. Se determinó una afinidad de unión mucho más débil para 191-A5, 197-B1, 197-D1, 197-H2 y 197-D2 (Fig. 5). Las moléculas, o sus derivados, se caracterizaron más a fondo mediante otros ensayos de unión de pull-down, mediciones de resonancia de plasmón y un ensayo de quimiotaxis in vitro. El ácido nucleico de unión a SDF-1 de Tipo C 191-D5-001 se caracterizó para su afinidad de unión a la SDF-1 humana, mientras que se determinó la constante de unión en equilibrio  $K_D$  mediante una medición de resonancia de plasmón de superficie ( $K_D = 0,8$  nM, Fig. 21). Se midió una  $IC_{50}$  (concentración inhibidora del 50%) de 0,2 nM para 191-D5-001 empleando un ensayo de quimiotaxis de cultivo celular in vitro. La afinidad de unión del ácido nucleico de unión a SDF-1 de Tipo C 197-B2 por la SDF-1 humana se determinó mediante una medición de resonancia de plasmón de superficie ( $K_D = 0,9$  nM), y su  $IC_{50}$  (concentración inhibidora del 50%) de 0,2 nM se analizó en un ensayo de 15 quimiotaxis de cultivo celular in vitro. Estos datos indican que los ácidos nucleicos de unión a SDF-1 de Tipo C 191-D5-001 y 197-B2 tienen una afinidad de unión similar por SDF-1 (Figs. 5 y 8).

El ácido nucleico de unión a SDF-1 de Tipo C 190-A3-001 (48 nt) comprende un tramo 5'-terminal de 17 nucleótidos y un tramo 3'-terminal de 12 nucleótidos, en los que, por una parte los cuatro nucleótidos del extremo 5' del tramo 5' terminal y los cuatro nucleótidos del extremo 3' del tramo 3'-terminal pueden hibridarse entre sí para formar una hélice terminal. Como alternativa, los nucleótidos 'UGAGA' en el tramo 5'-terminal pueden hibridarse con los nucleótidos 'UCUCA' en el tramo 3'-terminal para formar una hélice terminal. Una reducción a ocho nucleótidos del tramo 5'-terminal ('GAGAUAGG') y a nueve nucleótidos del tramo 3'-terminal ('CUGAUUCUC') de la molécula 190-A3-001 (con lo cual, seis de los ocho/nueve nucleótidos del tramo 5'- y 3'-terminal pueden hibridarse entre sí) no influye en la afinidad de unión con SDF-1 (190-A3-004; Fig. 6 y Fig. 19). La constante de unión en equilibrio  $K_D$  de 190-A3-004 se determinó empleando el ensayo de unión de pull-down ( $K_D = 4,6$  nM, Fig. 20) y mediante una medición de resonancia de plasmón de superficie ( $K_D = 4,7$  nM). Se midió una  $IC_{50}$  (concentración inhibidora del 50%) de 0,1 nM para 190-A3-004 empleando un ensayo de quimiotaxis de cultivo celular in vitro (Fig. 22). Sin embargo, el truncado a dos nucleótidos en el tramo 5'-terminal conduce a una reducción muy fuerte en la afinidad de unión (190-A3-007; Fig. 6 y Fig. 19).

Los ácidos nucleicos de unión a SDF-1 de Tipo C 191-D5-001, 197-B2 y 197-H1 (secuencia de nucleótidos central: GGUUAGGGCUAGAAGUCGG), 197-H3/191-A5 (secuencia de nucleótidos central: GGUUAGGGCUCGAAGUCGG) y 197-E3/197-B1 (secuencia de nucleótidos central: GGUUAGGGCUUGAAGUCGG) comparten una secuencia de nucleótidos central casi idéntica (Fórmula 4 de Tipo C; secuencia de nucleótidos: GGUUAGGGCUHGAAGUCGG). 191-D5-001, 197-B2 y 197-H1 no comparten un tramo 5'- y 3'-terminal similar (197-H3 y 197-E3 tienen un tramo 5'- y 3'-terminal idéntico a 197-B2). Sin embargo, los respectivos diez (197-B2, 197-E3, 197-H3) o nueve de los diez (191-D5-001, 197-H1) nucleótidos del tramo 5'-terminal pueden hibridarse con los respectivos diez (197-B2, 197-E3, 197-H3) o nueve de los diez (191-D5-001, 197-H1) nucleótidos del tramo 3'-terminal (Fig. 5). Por tanto, el tramo 5' terminal de los ácidos nucleicos de unión a SDF-1 de Tipo C 197-B2, 191-D5-001, 197-H1, 197-E3 y 197-H3, como se mencionó anteriormente, más 191-A5, 197-B1, 197-H2, 197-D1 y 197-D2 comprenden una secuencia de nucleótidos genérica común de 'RKSBUSNVGR' (Fórmula 5-5' de Tipo C). El tramo 3'-terminal de los ácidos nucleicos de unión a SDF-1 de Tipo C 197-B2, 191-D5-001, 197-H1, 197-E3, y 197-H3, como se mencionó anteriormente, más 191-A5, 197-B1, 197-H2, 197-D1 y 197-D2 comprenden una secuencia de nucleótidos genérica común de 'YNNRCASSMY' (Fórmula 5-3' de Tipo C), prefiriéndose los tramos 5'- y 3'-terminales de los ácidos nucleicos de unión a SDF-1 de tipo C 197-B2, 191-D5-001, 197-H1, 197-E3 y 197-H3. Estos tramos 5'- y 3'-terminales preferidos de los ácidos nucleicos de unión a SDF-1 de Tipo C 197-B2, 191-D5-001, 197-H1, 197-E3 y 197-H3 pueden resumirse con la fórmula genérica 'RKBUGSVGR' (Fórmula 6-5' de Tipo C; tramo 5'-terminal) y 'YCNRCASSMY' (Fórmula 6-3' de Tipo C; tramo 3'-terminal).

Se construyeron los derivados truncados del ácido nucleico de unión a SDF-1 de Tipo C 191-D5-001 y se analizaron en un ensayo de unión de pull-down competitivo frente a la molécula original 191-D5-001 (Fig. 7A, Fig. 7B y Fig. 19).

Al principio, la longitud de los tramos 5'- y 3'-terminales se acortó desde diez nucleótidos (191-D5-001) en cada uno a siete nucleótidos (191-D5-004), como se muestra en la Fig. 7A, con lo cual nueve de los diez (191-D5-001) o seis de los siete nucleótidos (191-D5-004) del tramo 5'-terminal y del tramo 3'-terminal, respectivamente, pueden hibridarse entre sí. La reducción a siete nucleótidos del tramo 5'- y 3'-terminal, respectivamente (en los que seis de los siete nucleótidos pueden hibridarse entre sí), conduce a una afinidad de unión reducida con la SDF-1 (191-D5-004). Los tramos terminales del ácido nucleico de unión a SDF-1 de Tipo C 191-D5-004 se modificaron, por lo cual el nucleótido sin apareamiento 'A' dentro del tramo 3'-terminal de 191-D5-004 fue sustituido por una 'C' (191-D5-005). Esta modificación condujo a una mejora en la unión. Este derivado, el ácido nucleico de unión a SDF-1 de Tipo C 191-D5-005, muestra una unión a la SDF-1 similar al 191-D5-001. Otro truncado del tramo 5'- y 3'-terminal a cinco nucleótidos, respectivamente, condujo a una molécula con una longitud total de 29 nucleótidos (191-D5-007). Debido a las similitudes de 191-D5-001 y los ácidos nucleicos de unión a SDF-1 de Tipo C 197-B2, 191-D5-001, 197-H1, 191-A5, 197-H3, 197-B1, 197-E3, 197-D1, 197-H2 y 197-D2, y debido a los datos extraídos mostrados por 191-D5-007, puede suponerse que el tramo 5'- y 3'-terminal en principio puede truncarse hasta cinco nucleótidos, por lo cual la secuencia de nucleótidos 'CGGGA' para el tramo 5'-terminal y 'UCCCG' para el tramo 3'-terminal se ensayó con éxito (ácido nucleico de unión a SDF-1 de Tipo C 191-D5-007). De modo sorprendente, el ácido nucleico de unión a SDF-1 de Tipo C 191-D5-007 se une algo mejor a SDF-1 que 191-D5-001 (determinado al nivel de aptámero empleando el ensayo de unión competitiva). La constante de unión en equilibrio  $K_D$  de 191-D5-007 se determinó empleando el ensayo de unión de pull-down ( $K_D = 2,2$  nM, Fig. 20) y mediante una medición de resonancia de plasmón de superficie ( $K_D = 0,8$  nM, Fig. 21). Se midió una  $IC_{50}$  (concentración inhibitoria del 50%) de 0,1 nM para 191-D5-007 empleando un ensayo de quimiotaxis de cultivo celular in vitro. Se realizó otro truncado en ambos tramos terminales a cuatro nucleótidos (191-D5-010, Fig. 7A).

Otros derivados del ácido nucleico de unión a SDF-1 de Tipo C 191-D5-001 (191-D5-017/ -024/ -029) que portan tramos 5'- y 3'-terminales de cuatro nucleótidos cada uno respectivamente también mostraron una afinidad de unión reducida por SDF-1 en el ensayo de unión de pull-down competitivo frente a 191-D5-007 (Fig. 7B). También se ensayan unos tramos 5'- y 3'-terminal alternativos con una longitud respectiva de cinco nucleótidos (191-D5-017-29a, 191-D5-017-29b, 191-D5-019-29a, 191-D5-024-29a, 191-D5-024-29b). La fórmula genérica de estos derivados para el tramo 5'-terminal es 'XsSSSV' (Fórmula 7-5' de Tipo C) y para el tramo 3'-terminal es 'BSSSXs' (Fórmula 7-3' de Tipo C), en las que Xs está ausente o es 'S'. Dos de los cinco variantes ensayados mostraron una afinidad de unión con SDF-1 idéntica a 191-D5-007 (191-D5-024-29a, 191-D5-024-29b; Fig. 7B). Las secuencias de los tramos 5'-terminal y 3'-terminal de los derivados de 191-D5-001 que muestran la mejor afinidad de unión con SDF-1 y que comprenden un tramo 5'-terminal y 3'-terminal de cinco nucleótidos respectivamente (191-D5-007, 191-D5-024-29a, 191-D5-024-29b) pueden resumirse con una fórmula genérica (tramo 5'-terminal: 'SGGSR', Fórmula 8-5' de Tipo C; tramo 3'-terminal: 'YSCCS', Fórmula 8-3' de Tipo C).

Los derivados truncados del ácido nucleico de unión a SDF-1 de Tipo C 197-B2 se analizaron en un ensayo de unión de pull-down competitivo frente a la molécula original 197-B2 y 191-D5-007 (Fig. 8). Empleando el ensayo de unión de pull-down competitivo frente a 191-D5-007 se demostró que 197-B2 tiene la misma afinidad de unión con SDF-1 que 191-D5-007. Los tramos 5'- y 3'-terminal se acortaron sin pérdida de afinidad de unión desde diez nucleótidos (197-B2) cada uno a cinco nucleótidos cada uno (197-B2-005), con lo que los nucleótidos del tramo 5'-terminal y del tramo 3'-terminal pueden hibridarse completamente entre sí. Si el tramo 5'-terminal ('GCGGG') y el tramo 3'-terminal ('CCUGC') de 197-B2-005 se sustituye por 'GCCGG' (tramo 5'-terminal) y por 'CCGGC' (tramo 3'-terminal) de 197-B2-006, la afinidad de unión con SDF-1 persiste totalmente. Debido a que 197-B2 y 191-D5-001 (y sus derivados) comparten la secuencia de nucleótidos central idéntica (GGUUAGGGCUAGAAGUCGG) y se habían ensayado varios derivados de 191-D5 con tramos 5'- y 3'-terminal con una longitud de cuatro nucleótidos respectivamente, se omitió otro truncado más del tramo 5'- y 3'-terminal. Se diseñaron dos derivados más que comprenden seis nucleótidos en el extremo 5' y 3' (tramos 5'- y 3'-terminales) respectivamente. La afinidad de unión con SDF-1 de ambas moléculas (197-B2-006-31a y 197-B2-006-31b) es la misma que la mostrada por 191-D5-007 y 197-B2-006 (Fig. 8). Las secuencias de los tramos 5'-terminal y 3'-terminal del derivado de 197-B2 que muestran la mejor afinidad de unión con SDF-1 y que comprenden un tramo 5'-terminal y 3'-terminal de cinco nucleótidos respectivamente pueden resumirse con una fórmula genérica (tramo 5'-terminal: 'GCSGG', Fórmula 9-5' de Tipo C; tramo 3'-terminal: 'CCKGC', Fórmula 9-3' de Tipo C).

Combinando los tramos 5'- y 3'-terminales preferidos de los ácidos nucleicos de unión a SDF-1 de Tipo C 191-D5001 (tramo 5'-terminal: 'SGGSR', Fórmula 8-5' de Tipo C; tramo 3'-terminal: 'YSCCS', Fórmula 8-3' de Tipo C) y 197-B2 (tramo 5'-terminal: 'GCSGG', Fórmula 9-5' de Tipo C; tramo 3'-terminal: 'CCKGC', Fórmula 9-3' de Tipo C), la fórmula genérica preferida común para el tramo 5'-terminal y 3'-terminal es 'SSSSR' (tramo 5'-terminal, Fórmula 10-5' de Tipo C) y 'YSBSS' (tramo 3'-terminal: Fórmula 10-3' de Tipo C).

#### 1.4 Otros ácidos nucleicos de unión a SDF-1

Además, se identificaron otros tres ácidos nucleicos de unión a SDF-1 que no comparten los motivos de unión a SDF-1 de 'Tipo A', 'Tipo B' y 'Tipo C'. Se analizaron como aptámeros empleando el ensayo de unión de pull-down (Fig. 9).

Debe entenderse que cualquiera de las secuencias mostradas en las Figuras 1 a 9 son ácidos nucleicos según la presente invención, que incluyen no sólo las formas truncadas de las mismas, sino también incluyen sus formas

extendidas, con la condición de que las moléculas de ácidos nucleicos así truncadas y extendidas, respectivamente, aún sean capaces de unirse a la diana.

Ejemplo 2: Modificación de PEG de 40 kDa y otras modificaciones de los Spiegelmeros de unión a SDF-1

5 Para prolongar el tiempo de residencia plasmático in vivo de los Spiegelmeros, los Spiegelmeros 193-G2-012, 192A10-008, 191-D5-007, 197-B2-006 y 197-B2-006-31b se acoplaron covalentemente con un resto de polietilenglicol (PEG) de 40 kDa en el extremo 5', según se describe en el capítulo 3 (clones PEGilados: 193-G2-012-5'-PEG, 192-A10-008-5'-PEG, 191-D5-007-5'-PEG, 197-B2-006-5'-PEG y 197-B2-006-31b-5'-PEG).

10 Las moléculas de Spiegelmeros PEGilados se analizaron en un ensayo TAX de cultivo celular in vitro (Capítulo 5) y mediante mediciones de resonancia de plasmón empleando un instrumento Biacore (Capítulo 6). Todos los Spiegelmeros modificados con PEG de 40 kDa siguen siendo capaces de inhibir la quimiotaxis inducida por SDF-1 y de unirse a SDF-1 en un estrecho intervalo nanomolar (Figs. 23A, 23B, 24A y Fig. 24B).

15 Además, el Spiegelmero de unión a SDF 192-A10-001 se modificó con PEG de 40 kDa, PEG de 30 kDa, HES de 100 kDa o HES de 130 kDa (clones PEGilados: 192-A10-001-5'-PEG40, 192-A10-001-5'-PEG30, 192-A10-001-5'-HES100, 192-A10-001-5'-HES130; procedimiento de acoplamiento en el capítulo 3). Tal como se muestra en la Fig. 25A y la Fig. 25B ni el resto PEG ni el resto HES influyen en la potencia de los Spiegelmeros para inhibir la quimiotaxis inducida por SDF-1.

Ejemplo 3: Síntesis y derivatización de Aptámeros y Spiegelmeros

### 3.1 Síntesis a pequeña escala

20 Se produjeron Aptámeros y Spiegelmeros mediante una síntesis en fase sólida con un sintetizador ABI 394 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.) empleando la química de 2'TBDMS y ARN fosforamidita (Damha y Ogilvie, 1993). Las rA(NBz)-, rC(Ac)-, rG(N-ibu)-, y rU-fosforamiditas en la configuración D y L se adquirieron en ChemGenes, Wilmington, MA. Los Aptámeros y los Spiegelmeros se purificaron mediante electroforesis en gel.

### 3.2 Síntesis a gran escala más modificación

25 Se produjeron los Spiegelmeros mediante una síntesis en fase sólida con un sintetizador ÄktaPilot100 (Amersham Biosciences; General Electric Healthcare, Friburgo) empleando la química de 2'TBDMS y ARN fosforamidita (Damha y Ogilvie, 1993). Las L-rA(N-Bz)-, L-rC(Ac)-, L-rG(N-ibu)-, and L-rU- fosforamiditas se adquirieron en ChemGenes (Wilmington, MA, EE.UU.). El modificador de 5'-amino se adquirió en American International Chemicals Inc. (Framingham, MA, EE.UU.). La síntesis de los Spiegelmeros comenzó con CPG L-riboG; L-riboC, L-riboA, L-riboU respectivamente modificados con tamaño de poro 1000 Å (Link Technology, Glasgow, Reino Unido). Para el acoplamiento (15 minutos por ciclo), se empleó benciltiotetrazol 0,3 M (American International Chemicals Inc., Framingham, MA, EE.UU.) en acetonitrilo, y 3,5 equivalentes de la respectiva disolución de fosforamidita 0,2 M en acetonitrilo. Se empleó un ciclo de cierre de la oxidación. Otros reactivos y disolventes convencionales para la síntesis de oligonucleótidos se adquirieron en Biosolve (Valkenswaard, Países Bajos). Los Spiegelmeros se sintetizaron con DMT-ON; después de la desprotección se purificaron a través de RP-HPLC preparativa (Wincott F. et al., 1995) empleando el medio Source15RPC (Amersham). El grupo 5'DMT se retiró con ácido acético al 80% (90 minutos a temperatura ambiente). Después se añadió una disolución acuosa de NaOAc 2 M y el Spiegelmero se desaló mediante una filtración con flujo tangencial empleando una membrana de celulosa regenerada 5 K (Millipore, Bedford, MA).

### 3.3 Pegilación

40 Para prolongar el tiempo de residencia plasmático in vivo de los Spiegelmeros, los Spiegelmeros se acoplaron covalentemente con un resto polietilenglicol (PEG) de 40 kDa en el extremo 5'.

45 Para la PEGilación (para obtener datos técnicos del método para la PEGilación, véase la solicitud de Patente Europea EP 1 306 382), el Spiegelmero modificado en el 5'-amino purificado se disolvió en una mezcla de H<sub>2</sub>O (2,5 ml), DMF (5 ml), y tampón A (5 ml; preparado mezclando ácido cítrico • H<sub>2</sub>O [7 g], ácido bórico [3,54 g], ácido fosfórico [2,26 ml], y NaOH 1 M [343 ml] y añadiendo agua hasta un volumen final de 11; pH = 8,4 que se ajustó con HCl 1 M).

50 El pH de la disolución del Spiegelmero se llevó a 8,4 con NaOH 1 M. Después se añadió PEG-NHS éster 40 kDa (Nektar Therapeutics, Huntsville, AL) a 37 °C cada 30 minutos en seis porciones de 0,25 equivalentes hasta alcanzar un rendimiento máximo del 75 al 85%. El pH de la mezcla de reacción se mantuvo a 8-8,5 con NaOH 1 M durante la adición del PEG-NHS éster.

La mezcla de reacción se mezcló con 4 ml de una disolución de urea (8 M), y 4 ml de tampón B (acetato de trietilamonio 0,1 M en H<sub>2</sub>O) y se calentó hasta 95 °C durante 15 minutos. El Spiegelmero PEGilado se purificó después mediante RP-HPLC con medio Source 15RPC (Amersham), empleando un gradiente de acetonitrilo (tampón B; tampón C: acetato de trietilamonio 0,1 M en acetonitrilo). El exceso de PEG eluye en tampón C al 5%, y

el Spiegelmero PEGilado en el tampón C al 10-15%. Las fracciones del producto con una pureza >95% (evaluada mediante HPLC) se juntaron y se mezclaron con 40 ml de NaOAc 3 M. El Spiegelmero PEGilado se desaló mediante una filtración con flujo tangencial (membrana de celulosa regenerada 5 K, Millipore, Bedford, MA).

### 3.4 HESilación

- 5 Para prolongar el tiempo de residencia plasmático in vivo de los Spiegelmeros, los Spiegelmeros se acoplaron covalentemente con hidroxiletil almidón (HES, de sus siglas en inglés) de diversos pesos moleculares >130 kDa y grado de sustitución >0,5. El extremo 5' del Spiegelmero es el sitio preferido para la conjugación.

10 Para la HESilación (para obtener detalles técnicos del método para la HESilación de ácidos nucleicos, véase la Patente Offenlegungsschrift alemana DE 101 12 825 A1, y para los ácidos nucleicos-D/L la Patente PCT WO 02/080979 A2), el Spiegelmero modificado en el 5'-amino purificado se disolvió en bicarbonato de sodio (0,3 M, 1 ml) y el pH se ajustó a 8,5.

15 Con respecto al Spiegelmero, se añadió un exceso en 5 veces de ácido HES libre (3,3 mmol, Supramol, Rosbach, Alemania) y carbonato de di(N-succinimidilo) (3,3 mmol) a N,N-dimetilformamida (1 ml) para producir una disolución del N-hidroxisuccinimida éster de HES activado. Para disolver todos los reactivos, la mezcla se agitó brevemente a 60 °C, se enfrió hasta 25 °C y después se agitó durante 1,5 horas a 25 °C. La disolución del Spiegelmero se añadió a la disolución del HES activado, y la mezcla resultante se agitó a 25 °C y pH 8,5. La reacción se controló mediante IEX-HPLC analítica. Generalmente, la conjugación se desarrolla hasta >75 % dentro de 1 hora.

20 Para la purificación con IEX-HPLC a través del medio Source 15Q (GE, Friburgo, Alemania), la mezcla de reacción se mezcló con una cantidad de 10 veces del tampón A (EDTA 1 mM, Tris 25 mM, NaClO<sub>4</sub> 10 mM en agua/acetonitrilo 9:1, pH 4). El exceso de HES eluye a tampón A al 5% (EDTA 1 mM, Tris 25 mM, NaClO<sub>4</sub> 500 mM en agua/acetonitrilo 9:1, pH 4), mientras que el conjugado de HES-Spiegelmero eluye a tampón B al 20-30%. Las fracciones del producto con una pureza >95% (evaluada mediante HPLC) se juntaron y se desalaron mediante una filtración con flujo tangencial (membrana de celulosa regenerada 5 K, Millipore, Bedford MA).

Ejemplo 4: Determinación de las constantes de unión (ensayo de unión de pull-down)

#### 25 4.1 Ensayo de unión de pull-down directo

Se midió la afinidad de los aptámeros por la D-SDF-1 humana biotinilada en un formato de ensayo de unión de pull-down a 37 °C. Los aptámeros se marcaron en 5'-fosfato con una T4 polinucleótido quinasa (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania) empleando ATP marcado con [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] (Hartmann Analytic, Braunschweig, Alemania). La radiactividad específica de los aptámeros marcados era de 200.000-800.000 cpm/pmol. Los aptámeros se incubaron después de una desnaturalización y una renaturalización a una concentración de 10, 20, 30 ó 40 pM a 37 °C en tampón de selección (Tris-HCl 20 mM, pH 7,4; NaCl 137 mM; KCl 5 mM; MgCl<sub>2</sub> 1 mM; CaCl<sub>2</sub> 1 mM; Tween-20 al 0,1% [p/vol]), junto con cantidades variables de D-SDF-1 humana biotinilada durante 4-12 horas para alcanzar el equilibrio a bajas concentraciones. El tampón de selección se enriqueció con albúmina de suero humana 10 µg/ml (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania), y ARN de levadura 10 µg/ml (Ambion, Austin, EE.UU.) para evitar la adsorción de los compañeros de unión a la superficie del equipo de plástico empleado o a la matriz de inmovilización. El intervalo de concentración de la D-SDF-1 humana biotinilada se ajustó de 8 pM a 100 nM; el volumen total de reacción era de 1 ml. El péptido y los complejos de péptido-aptámero se inmovilizaron sobre 1,5 µl de partículas Streptavidin Ultralink Plus (Pierce Biotechnology, Rockford, EE.UU.) que habían sido pre-equilibradas con tampón de selección y resuspendidas en un volumen total de 6 µl. Las partículas se mantuvieron en suspensión durante 30 minutos a la respectiva temperatura en un termomezclador. La radiactividad inmovilizada se cuantificó en un contador de centelleo después de retirar el sobrenadante y de un lavado apropiado. El porcentaje de unión se representó gráficamente frente a la concentración de la D-SDF-1 humana biotinilada y se obtuvieron las constantes de disociación empleando algoritmos de programas informáticos (GRAFIT; Erithacus Software; Surrey, Reino Unido) suponiendo una estequiometría 1:1.

#### 45 4.2 Ensayo de unión de pull-down competitivo

Con el fin de comparar los diferentes aptámeros de unión a D-SDF-1 se realizó un ensayo de clasificación competitivo. Para este objetivo, el aptámero más afín disponible se marcó de forma radiactiva (véase anteriormente) y sirvió como referencia. Después de una desnaturalización y una renaturalización se incubó a 37 °C con D-SDF-1 humana biotinilada en 1 ml de tampón de selección bajo unas condiciones que producen una unión de aproximadamente 5-10% del péptido después de una inmovilización y un lavado sobre agarosa NeutrAvidin o Streptavidina Ultralink Plus (ambas de Pierce) sin competición. Se añadió un exceso de variantes de aptámeros de ARN-D no marcados desnaturalizados y renaturalizados a diferentes concentraciones (por ejemplo, 2, 10 y 50 nM) al aptámero de referencia marcado para realizar reacciones de unión en paralelo. Los aptámeros que se van a ensayar compiten con el aptámero de referencia por la unión a la diana, disminuyendo, por lo tanto, la señal de unión dependiendo de sus características de unión. El aptámero que resultó más activo en este ensayo después puede servir como nueva referencia para análisis comparativos de otros variantes de aptámeros.

Ejemplo 5: Análisis de la inhibición de la quimiotaxis inducida por SDF-1 por los Spiegelmeros de unión a SDF-1

5 Se cultivaron células de leucemia de células T humanas de Jurkat (obtenidas en DSMZ, Braunschweig) a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5% en medio RPMI 1640 con Glutamax (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania) que contiene suero bovino fetal al 10%, penicilina 100 unidades/ml y estreptomycin 100 µg/ml (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania). Un día antes del experimento, las células se sembraron en un nuevo matraz a una densidad de 0,3 x 10<sup>6</sup>/ml (9 x 10<sup>6</sup>/30 ml) en medio convencional (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania).

10 Para el experimento, las células se centrifugaron (5 minutos a 300 g), se resuspendieron, se contaron y se lavaron una vez con 15 ml de HBH (disolución salina equilibrada de Hank que contiene albúmina de suero bovina 1 mg/ml y HEPES 20 mM; Invitrogen, Karlsruhe, Alemania). Después las células se resuspendieron a 3 x 10<sup>6</sup>/ml o 1,33 x 10<sup>6</sup>/ml, dependiendo del tipo de placa de filtro utilizada. Después se dejó que las células migrasen a través de las membranas porosas de las placas de filtro durante varias horas hacia una disolución que contiene SDF-1 y diversas cantidades de Spiegelmero. Se emplearon bien placas Transwell e inserciones con membrana de policarbonato poroso, tamaño de poro de 5 µm (Corning; 3421) o placas MultiScreen MIC (Millipore, MAMIC5S10).

### 5.1 Protocolo para las placas Transwell

15 Las disoluciones de estimulación (SDF-1 + diversas concentraciones de Spiegelmero) se constituyeron con 600 µl de HBH en los compartimentos inferiores de las placas Transwell y se incubaron durante 20-30 minutos. Todas las condiciones se constituyeron al menos dos veces. Las inserciones se trasladaron a los pocillos que contenían las disoluciones de estimulación y se añadieron 100 µl de una suspensión de células de 3 x 10<sup>6</sup>/ml a las inserciones (3 x 10<sup>5</sup> células/pocillo). Después se dejó que las células migrasen durante 3 horas a 37 °C.

20 Después, se retiraron las inserciones y se añadieron 60 µl de una disolución de trabajo de resazurina (Sigma, Deisenhofen, Alemania) (440 µM en PBS; Biochrom, Berlín, Alemania) a los pocillos (también a los pocillos de calibración). Las placas se incubaron entonces a 37 °C durante 2,5 a 3 horas. Después de la incubación, se trasladaron 200 µl de cada pocillo a una placa negra de 96 pocillos. La medición de las señales de fluorescencia se realizó a 544 nm (excitación) y 590 nm (emisión) en un lector de placas de multidetección Fluostar Optima (BMG, Offenburg, Alemania).

### 25 5.2 Protocolo para las placas Millipore MultiScreen

30 Se constituyeron las disoluciones de estimulación (SDF-1 + diversas concentraciones de Spiegelmero) como disoluciones 10X en una placa de 96 tubos de perfil bajo de 0,2 ml. Se pipetearon 135 µl de HBH en los compartimentos inferiores de la placa MultiScreen y se añadieron 15 µl de las disoluciones de estimulación. Todas las condiciones se constituyeron por triplicado. Después de 20 a 30 minutos, la placa de filtro se insertó en la placa que contenía las disoluciones de estimulación y se añadieron 75 µl de una suspensión de células de 1,33 x 10<sup>6</sup>/ml a los pocillos de la placa de filtro (1 x 10<sup>5</sup> células/pocillo). Después se dejó que las células migrasen durante 3 horas a 37 °C.

Después, se retiró la placa de inserción y se añadieron 20 µl de una disolución de trabajo de resazurina (440 µM en PBS) a los pocillos inferiores. Después las placas se incubaron a 37 °C durante 2,5 a 3 h.

35 Después de la incubación, se trasladaron 100 µl de cada pocillo a una placa negra de 96 pocillos. La medición de las señales de fluorescencia se realizó como se describió anteriormente.

### 5.3 Evaluación

40 Para la evaluación, los valores de fluorescencia se corrigieron para la fluorescencia de fondo (pocillo sin células). Después se calculó la diferencia entre las condiciones experimentales con y sin SDF-1. Se estableció que el valor para la muestra sin Spiegelmero (sólo SDF-1) era 100%, y los valores para las muestras con Spiegelmero se calcularon como porcentaje de esto. Para la curva de dosis-respuesta, los valores de porcentaje se representaron gráficamente frente a la concentración de Spiegelmero y se determinó el valor de IC<sub>50</sub> (concentración de Spiegelmero a la cual se presenta 50% de la actividad sin Spiegelmero) gráficamente a partir de la curva resultante.

### 5.4 Resultados

#### 45 5.4.1 Estimulación dependiente de la dosis de células Jurkat por la SDF-1 humana

Se descubrió que la SDF-1 humana estimula la migración de células Jurkat de una manera dependiente de la dosis, estando la estimulación semimáxima a aproximadamente 0,3 nM (Fig. 11).

#### 5.4.2 Inhibición dependiente de la dosis de la quimiotaxis inducida por SDF-1 humana por los Spiegelmeros de unión a SDF-1

50 Cuando se deja que las células migren hacia una disolución que contiene SDF-1 humana más concentraciones crecientes de Spiegelmeros de unión a SDF-1, se observa una inhibición dependiente de la dosis. Las IC<sub>50</sub> respectivas de los Spiegelmeros ensayados se especifican en el Ejemplo 1. Cuando se emplea un Spiegelmero Control no específico en lugar de los Spiegelmeros de unión a SDF-1, no se observa efecto inhibitor hasta 1 µM (Fig. 26).

#### 5.4.3 Inhibición dependiente de la dosis de la quimiotaxis inducida por SDF-1 de ratón por los Spiegelmeros de unión a SDF-1

La SDF-1 se conserva bien a través de las especies: la SDF-1 de ratón se diferencia de la SDF-1 $\alpha$  humana en un aminoácido (isoleucina en la posición 18 en lugar de valina). La SDF-1 murina puede estimular la quimiotaxis de células Jurkat (Fig. 27) y se ha descubierto que esta acción es inhibida por los Spiegelmeros 192-A10-001 y 191-D5-007-5'-PEG con la misma potencia que en el caso de la SDF-1 humana (Fig. 28).

#### Ejemplo 6: Análisis de unión mediante medición de resonancia de plasmón de superficie

Se empleó el instrumento Biacore 2000 (Biacore AB, Uppsala, Suecia) para analizar la unión de los Spiegelmeros a la SDF-1 $\alpha$  humana. Cuando se intenta conseguir el acoplamiento de la SDF-1 $\alpha$  a través de grupos amina, la SDF-1 $\alpha$  se dializa contra agua durante 1-2 horas (ésteres de celulosa mixtos Millipore VSWP; tamaño de poro, 0,025  $\mu$ m) para eliminar las aminas de interferencia. Se activaron chips detectores CM4 (Biacore AB, Uppsala, Suecia) antes del acoplamiento de la proteína mediante una inyección de 35  $\mu$ l de una dilución 1:1 de NHS 0,4 M y EDC 0,1 M con un flujo de 5  $\mu$ l/minuto. Después se inyectó la quimioquina en concentraciones de 0,1-1,5  $\mu$ g/ml con un flujo de 2  $\mu$ l/minuto hasta que la respuesta del instrumento alcanzó un intervalo de 1000-2000 UR (unidades relativas). Los NHS ésteres sin reaccionar se desactivaron mediante una inyección de 35  $\mu$ l de una disolución de clorhidrato de etanolamina (pH 8,5) con un flujo de 5  $\mu$ l/minuto. El chip detector se cebó dos veces con tampón de unión y se equilibró a 10  $\mu$ l/minuto durante 1-2 horas hasta que la línea de base se estabilizó. Para todas las proteínas, se evaluaron los parámetros cinéticos y las constantes de disociación mediante una serie de inyecciones del Spiegelmero en concentraciones de 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25 y 0 nM en tampón de selección (Tris-HCl, 20 mM; NaCl, 137 mM; KCl, 5 mM; CaCl<sub>2</sub>, 1 mM; MgCl<sub>2</sub>, 1 mM; Tween20 al 0,1% [p/v]; pH 7,4). En todos los experimentos, el análisis se realizó a 37 °C empleando el comando Kinject que define un tiempo de asociación de 180 y un tiempo de disociación de 360 segundos en un flujo de 10  $\mu$ l/minuto. El análisis de los datos y el cálculo de las constantes de disociación ( $K_D$ ) se realizó con el programa informático BIAevaluation 3.0 (BIACORE AB, Uppsala, Suecia) empleando el algoritmo de ajuste estequiométrico 1:1 Langmuir.

Ejemplo 7: Inhibición de la unión de [<sup>125</sup>J]-SDF-1 a células que expresan CXCR4 por los Spiegelmeros de unión a SDF-1

#### 7.1 Método

Se adquirió un clon de ADNc que codifica el receptor CXCR4 humano (NM\_003467.2) en OriGene Technologies (Rockville, MD) y se clonó en el vector pCR3.1 (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania). El vector resultante se transfeció en células CHO-K1 (DSMZ, Braunschweig, Alemania) empleando Lipofectamin 2000 (Invitrogen) y se seleccionaron las líneas celulares de expresión estable mediante tratamiento con geneticina. La expresión de los receptores se verificó mediante RT-PCR.

Para los ensayos de unión, las células que expresan CXCR4 se sembraron en placas de 24 pocillos revestidas con polilisina a una densidad celular de 1 x 10<sup>5</sup> células/pocillo y se cultivaron durante la noche a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5% en medio CHO-Ultra (Cambrex, Verviers, Bélgica) que contenía penicilina 50 unidades/ml, estreptomycin 50  $\mu$ g/ml y geneticina 0,5 mg/ml.

Para el experimento de unión, el medio se retiró y las células se lavaron una vez con disolución salina equilibrada de Hank, que contenía además HEPES 20 mM, albúmina de suero bovina 1 mg/ml, bacitracina 0,1 mg/ml (HBB). Después las células se incubaron en 0,2 ml de HBB durante 1 hora a temperatura ambiente junto con [<sup>125</sup>J]-SDF-1 50 pM (PerkinElmer, Rodgau, Alemania) y diversas concentraciones del Spiegelmero.

Se determinó la unión no específica añadiendo SDF-1 humana no marcada (R & D Systems, Wiesbaden, Alemania) a una concentración final de 0,5  $\mu$ M a varios pocillos.

Después del periodo de incubación, el sobrenadante se retiró y los pocillos se lavaron 3 veces con HBB enfriado en hielo. Después las células se lisaron con 0,1 ml de NaOH 0,1 M. Los lisados se trasladaron a viales de centelleo y, después de la adición de 4 ml de cóctel de centelleo líquido Unisafe 1 (Zinsser, Frankfurt, Alemania), se contaron en un contador de centelleo Beckman LS6500.

Puesto que los valores para la unión no específica (unión en presencia de una alta cantidad de SDF-1 sin marcar) son algo mayores que los valores para la unión total en presencia de altas concentraciones (500 pM) del Spiegelmero, se empleó la diferencia entre la unión máxima ("máx") y la unión en presencia de Spiegelmero 500 pM para el cálculo de los valores de IC<sub>50</sub>.

#### 7.2 Resultados

La representación gráfica de [<sup>125</sup>J]-SDF-1 unida frente a la concentración del Spiegelmero reveló que la unión de SDF-1 puede ser bloqueada por el Spiegelmero 192-A10-001 con una IC<sub>50</sub> de aproximadamente 60 pM (Fig. 29).

Ejemplo 8: Inhibición de la activación de MAP-quinasa inducida por SDF-1 por los Spiegelmeros de unión a SDF-1

## 8.1 Método

Se sembraron células CHO que expresan CXCR4 en placas de 6 pocillos en una densidad de  $0,5 \times 10^6$  células/pocillos y se cultivaron durante aproximadamente tres horas a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5% en medio CHO-Ultra (Cambrex, Verviers, Bélgica) que contenía penicilina 50 unidades/ml, estreptomicina 50 µg/ml y geneticina 0,5 mg/ml. Después de la unión de las células el medio se retiró y se sustituyó por medio F12 de Ham que contenía penicilina 50 unidades/ml, y estreptomicina 50 µg/ml. Después las células se incubaron durante la noche a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5%. Tres horas antes de la estimulación, el medio se sustituyó una vez más por medio F12 de Ham fresco. Las células se estimularon con SDF-1 humana 1 nM y diversas cantidades del Spiegelmero durante 5 ó 10 minutos. Después el medio se retiró y las células se lavaron rápidamente una vez con 1 ml de disolución salina tamponada con fosfato (PBS) enfriada en hielo, seguido de una lisis con tampón de muestra-SDS (Tris/HCl, pH 6,8, 62,5 mM; glicerol al 10%; SDS al 2%; azul de bromofenol al 0,01%; beta-mercaptoetanol al 5%). Se añadió 1 µl de benzonasa 0,5 u/µl (Merck, Darmstadt, Alemania) a cada pocillo y, después de una incubación durante 5 a 10 minutos a temperatura ambiente, los lisados se trasladaron a tubos Eppendorf, se incubaron a 95 °C durante 5 minutos y se conservaron a -20 °C hasta su posterior análisis.

Se separaron 25 µl de los lisados en geles de SDS-poliacrilamida desnaturizante al 10%. Después las proteínas se trasladaron mediante electrotransferencia a membranas de nitrocelulosa HybondECL (Amersham/GE Healthcare, Munich, Alemania). Después de la transferencia, las membranas se tiñeron con rojo Ponceau (al 0,2% en ácido tricloroacético al 3%) para el control de la carga y transferencia de proteínas, y después se bloquearon mediante una incubación en TBS-T (disolución salina tamponada con Tris (Tris/HCl 20 mM, pH 7,6, NaCl 137 mM) con Tween 20 al 0,1%) que contenía leche en polvo desnatada al 10% a 2-8 °C durante la noche.

La membrana entonces se incubó con anticuerpo anti-fosfo-MAP-quinasa de conejo (1:1000 en leche al 10% en TBS-T) durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de lavar tres veces durante 5 minutos con TBS-T, la membrana se incubó con conjugado de anti-IgG de conejo-HRP (1:2000 en leche al 10% en TBS-T) durante 1 hora a temperatura ambiente. Después la membrana se volvió a lavar tres veces durante 5 minutos con TBS-T, seguido de una incubación durante 1 minuto en reactivo quimioluminiscente LumiGlo<sup>®</sup>. La luminiscencia se detectó mediante una exposición a películas de quimioluminiscencia Hyperfilm<sup>™</sup>ECL (Amersham/GE Healthcare) durante 30 segundos a 2 minutos. Los anticuerpos y el reactivo de detección de luminiscencia son componentes del kit de anticuerpos de MAP quinasa (Thr202/Tyr204) PhosphoPlus p44/42 de Cell Signaling Technology (New England Biolabs, Frankfurt a.M., Alemania).

## 8.2 Resultados

La estimulación de células que expresan CXCR4 con SDF-1 humana 1 nM durante 5 minutos conduce a una estimulación profunda de la MAP-quinasa, indicada por un aumento en la intensidad de la banda que refleja la MAP-quinasa activada. Esta activación de la MAP-quinasa se puede inhibir de una manera dependiente de la dosis por el Spiegelmero 191-A10-001 (Fig. 30).

Ejemplo 9: Análisis funcional del Spiegelmero de unión a SDF-1 humana 193-G2-012-5'-PEG en un ensayo de germinación del anillo aórtico

Para ensayar si el Spiegelmero de unión a SDF-1 humana 193-G2-012-5'-PEG también es funcional en un ensayo de cultivos de órganos de angiogénesis convencional, se realizaron ensayos de germinación del anillo aórtico. Este ensayo, en el que se evalúan la longitud y la abundancia de extensiones similares a vasos desde los explantes, se ha convertido en el modelo de cultivo de órganos más ampliamente empleado para la angiogénesis (Auerbach et al., 2003). Ya se ha demostrado que la SDF-1 induce la germinación en este tipo de ensayo (Salcedo et al., 1999).

Se cortaron aortas de rata en anillos, se introdujeron en una matriz de colágeno y se incubaron con SDF-1 y con SDF-1 más el Spiegelmero de unión a SDF-1 humana 193-G2-012-5'-PEG o con SDF más un Spiegelmero control PEGilado no funcional que no se une a SDF-1. Después de 6 a 7 días se analizó la germinación (es decir, el crecimiento y extensión de células endoteliales) tomando fotografías y determinando un índice de germinación.

## 9.1 Método

Las aortas de ratas macho se obtuvieron en Bagheri Life Sciences (Berlín, Alemania). Las aortas se prepararon en fresco y se trasladaron en hielo en medio MCDB 131 (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania) que contenía penicilina 50 unidades/ml, estreptomicina 50 µg/ml (ambas de Invitrogen, Karlsruhe, Alemania) y fungizona 2,5 µg/ml (Cambrex, EE.UU.).

Para un experimento, una única aorta se trasladó a una placa de cultivo celular junto con el medio y se retiró el tejido conectivo residual. Después la aorta se cortó con un bisturí en anillos con una longitud de aproximadamente 1 a 2 mm. Los anillos se lavaron intensamente (al menos cinco veces) en Medio 199 (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania) y se colocaron en los pocillos de una placa de 24 pocillos que contenían 450 µl de disolución de colágeno por pocillo. Esta disolución de colágeno se preparó mezclando 9 ml de colágeno de cola de rata (3 mg/ml en ácido acético al 0,1%; Sigma, Deisenhofen, Alemania) con 1,12 ml de 10X Medio 199 (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania), 1,12 ml de 10X tampón de colágeno (NaOH 0,05 N, HEPES 200 mM, NaHCO<sub>3</sub> 260 mM) y 0,6 ml de glutamina 200 mM. Los

anillos se orientaron de tal forma que los bordes recortados se encontraban perpendiculares al fondo del pocillo. Se dejó que el colágeno solidificase incubando las placas durante al menos una hora a 37 °C. Después se añadió 1 ml de medio MCDB131 con adiciones (SDF-1 y Spiegelmeros) por pocillo. Los anillos se incubaron después a 37 °C durante seis a siete días. Como control de la germinación, los experimentos también se realizaron con VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular).

La germinación se documentó tomando fotografías con una cámara digital. En algunos casos, los anillos se fijaron mediante la adición de 1 ml de paraformaldehído al 10% y se conservaron a 2-8 °C para su posterior documentación. Las fotografías se analizaron con el programa informático de procesamiento de imágenes Scion Image. Después de una calibración con la ayuda de una fotografía tomada con un micrómetro portaobjetos, se trazó una línea a una distancia de 0,33 mm desde el borde de un anillo. El programa informático generó un histograma a lo largo de esta línea, los histogramas se imprimieron y se contaron los picos (que representan germinaciones que cruzan la línea). Este número se consideró el índice de germinación. Se evaluaron de 4 a 5 anillos por condición. El análisis estadístico se realizó con WinSTAT para Excel.

## 9.2 Resultados

Pudo demostrarse que la SDF-1 induce la germinación y que este efecto puede ser bloqueado por el Spiegelmero de unión a SDF-1 humana 193-G2-012-5'-PEG. No se observó bloqueo de la germinación inducida por SDF-1 con el Spiegelmero control PEGilado no funcional (Figuras 31 y 32).

Ejemplo 10: Movilización de células madre hematopoyéticas/células progenitoras hematopoyéticas (HSC/HPC) en ratones mediante una única inyección de NOX-A12 que se derivatizó con PEG de 30 ó 40 kDa

### 10.1 Sustancias de ensayo y esquema de administración

Los ratones se inyectaron i.v. con 13,4 mg/kg de Spiegelmero de unión a SDF-1 NOX-A12-JE40 (SEQ ID 132), Spiegelmero de unión a SDF-1 NOX-A12-NO30 (SEQ ID 242) o Spiegelmero control revNOX-A12 (SEQ ID 243) que no tienen actividad de unión a SDF-1. Una, seis, 24 ó 48 horas después de la inyección [5 ratones por sustancia y punto de tiempo] los animales sacrificaron y se recogió la sangre. Los grupos control se inyectaron con el vehículo (glucosa 5%), AMD-3100 (Sigma, Francia, 5 mg/kg s.c.) o con el factor estimulante de colonias (G-CSF, Neupogen) (2,5 µg/ratón/inyección, cada 12 horas). La finalización de los ratones se realizó en los mismos puntos que anteriormente (véase la Fig.33). Para el grupo con G-CSF (Neupogen): Debido al esquema de inyección de una inyección cada 12 horas los animales que terminaron a la hora, y a las seis horas recibieron, por lo tanto, sólo una inyección (a las 0 y 12 horas), el grupo que terminó a las 48 horas recibieron cuatro inyecciones (a las 0, 12, 24 y 36 horas) (véase la Fig. 33). El recuento de células sanguíneas se determinó en un hemocitómetro.

### 10.2 Detección de HSC/HPC

Se incubaron primero cincuenta (50) µl de sangre entera con reactivo bloqueante FcR (Ref 130-092-575, Miltenyi Biotec, París, Francia) en tampón de tinción (PBS[Ref 17-516F, Lonza], BSA 0,2% [Ref A7030, Sigma], NaN<sub>3</sub> 0,02% [Ref S2002, Sigma] y se incubaron después a temperatura ambiente en la oscuridad durante 30 minutos con FITC conjugado anti-CD117 y anticuerpos PE conjugado anti-Ly-6A/E o con los correspondientes isótopos (como se describe en la tabla de a continuación).

Antígenos	Clon	Isótopo	Fluorocromo	Ref	Fuente	Cantidad
CD117	2B8	IgG <sub>2b</sub>	FITC	553354	BD Biosciences	1 □g
Isótopo CD117	control	IgG <sub>2b</sub>	FITC	553998	BD Biosciences	1 □g
Ly-6A/E	D7	IgG <sub>2a</sub>	PE	553108		1 □g
Ly-6A/E control	isótopo	IgG <sub>2a</sub>	PE	553930		1 □g

Las células sanguíneas rojas se lisaron empleando el procedimiento "Fijar y lisar". En resumen, el tampón "Fijar y lisar" se prepara mediante la adición de 25µL de la disolución IOTest 3 (Disolución de Fijación 10X [Ref A07800, Beckman Coulter, Villepinte, France]) a 1 ml de VersaLyse [Ref A09777, Beckman Coulter] y se añadió 1 ml de la mezcla a las células teñidas. Después de agitar e incubar durante 10 minutos en oscuridad a temperatura ambiente, las células se centrifugaron y se lavaron una vez con 3 ml de tampón de tinción y se resuspendieron en 1 ml de disolución de microperlas de referencia (PKH26, Ref P7458, 220.000 perlas/ml, Sigma, ½ diluida en tampón de tinción). Las muestras se almacenaron en hielo protegido de la exposición de la luz hasta el análisis FACS.

Se analizó la superficie de fluorescencia de las células con un aparato citómetro de flujo (FACS, CyFlow® space) empleando una excitación por láser de 488 nm de longitud de onda. Se recogió un total de 10.000 casos por cada muestra.

10.3 Cálculo del número de células absolutas por  $\mu\text{L}$ 

El volumen de las muestras sanguíneas fue de 50  $\mu\text{L}$ . Al final del procedimiento de preparación, las células sanguíneas blancas (que se obtuvieron en la muestra de sangre de 50  $\mu\text{L}$ ) se resuspendieron en 0,75 ml de disolución de microperlas (obtenida mediante la  $\frac{1}{2}$  de disolución de stock que contienen 220.000 perlas en 1 mL). El número de células por mL de esta última disolución es:  $(\text{CN}/\text{BN}) \times (220000/2)$  y el número total de células es  $(\text{CN}/\text{BN}) \times (220000/2) \times (0,75/1)$ , donde CN es el número de recuentos para las células y NB es el número de recuentos para las microperlas.

Además, este número total de células se contienen en los 50  $\mu\text{L}$  de sangre y el número total de células (ACN) por  $\mu\text{L}$  es:  $(\text{CN}/\text{BN}) \times (220000/2) \times (0,75/1) \times (1/50)$ .

## 10.4 Determinación de unidades formadoras de colonias (UFC)

Se eligió sólo la sangre de estos puntos de tiempo con la cantidad máxima de células progenitoras hematopoyéticas (HPC)/células madre hematopoyéticas (HSC) para someterse a ensayos de UFC (un punto de tiempo idéntico para todos los ratones por sustancia). La reducción de células sanguíneas rojas (RBCs, de sus siglas en inglés) de las muestras de sangre periférica normal se realizó mediante la adición de 10 volúmenes 10x de tampón de lisis ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,8% con EDTA 0,1 mM) (ref. 07800, StemCell Technologies) para sangre periférica, mezclando invirtiendo el tubo 3-4 veces e incubando en hielo durante 5-15 minutos. Después de la centrifugación durante 7 minutos a 1.200 rpm, las células sanguíneas blancas (WBCs, de sus siglas en inglés) se lavaron dos veces con Medio Dulbecco Modificado (IMDM) que contiene suero bovino fetal inactivado por calor al 2% (FBS, Ref DE14-802F, Lonza). Las WBCs nucleadas se contaron empleando un hemocitómetro (contador MS9-5 (Melet Schloesing, Osny, Francia)) después de diluirse 1/20 en ácido acético 3% con azul de metileno (Ref 07060, StemCell Technologies).

Las células se cultivaron por triplicado en metilcelulosa 0,9% que contiene IMDM (Ref MethoCult® M03434, StemCell Technologies) que contiene FBS inactivado por calor al 2%, factor de células madre de ratón (rm) recombinante (SCF, (factor de células totipotenciales), crecimiento de células mastocitos y progenitores mieloides y linfoides), rm IL-3 y rh IL-6 (crecimiento para todos los linajes de progenitores mieloides tempranos), y eritropoyetina humana recombinante (rh EPO, crecimiento de progenitores eritroides). En resumen, se diluyeron WBCs concentrados 10 veces (0,4 ml) en metilcelulosa completa IMDM (concentración final a definir durante el experimento de validación), se invirtió cuidadosamente y se dejó durante 2-5 minutos para que las burbujas se disiparan antes de la dispensación. Se dispensaron 1,1 ml de metilcelulosa al medio que contienen la mezcla de células empleando una jeringa Luer-Lock y una aguja 16G de extremo romo (Ref 28110, StemCell Technologies) a cada uno de los tres platos de cultivo de 35 mm (Ref 27150, StemCell Technologies). Los platos se inclinaron y rotaron suavemente para distribuir la metilcelulosa. Los platos grandes destapados con agua estéril que contienen 35 mm se emplearon para sostener platos de 35 mm durante la incubación a 37 °C,  $\text{CO}_2$  5%, con una humedad del 95% durante 7 a 12 días. Al final de la incubación, las colonias se contaron manualmente como BFU-E (unidad formadora de eritroides grandes), CFU-GM (unidad formadora de colonias de granulocitos y/o macrófagos) y CFU-GEMM (unidad formadora de colonias de granulocitos, eritrocitos, macrófagos y megacariocitos) empleando un microscopio y un disco de puntuación cuadrículado de 60 mm (Ref 27500, StemCell Technologies). El número de colonias se normalizó para UFC/mL sangre.

## 10.5 Resultados de la citometría de flujo

Los Spiegelmeros que se unen a SDF-1 NOX-A12-JE40 y NOX-A12-NO30 conducen a un incremento marcado de HPC/HSC como se mide mediante CD117 y la tinción doble de Ly-6A/E en el análisis FACS (véase la Fig. 34). El pico se observó a las 6 horas después de la administración del Spiegelmero. NOX-A12-JE40 conduce a la liberación de 700 células  $\text{CD117}^+\text{Ly-6 A/E}^+$  por  $\mu\text{L}$ . El Spiegelmero NOX-A12-NO30 liberó 300 células  $\text{CD117}^+\text{Ly-6 A/E}^+$  por  $\mu\text{L}$  de sangre. En el grupo del vehículo se contaron 100 células  $\text{CD117}^+\text{Ly-6 A/E}^+$  por  $\mu\text{L}$  de sangre. El efecto de movilización de HSP/HPC de G-CSF se vio en los ratones que habían recibido 4 inyecciones de G-CSF y que se sacrificaron 48 horas después de la primera inyección (250 células  $\text{CD117}^+\text{Ly-6 A/E}^+$  por  $\mu\text{L}$  de sangre). AMD-3100 y el Spiegelmero de unión a SDF-1 NOX-A12-JE40 no mostraron ningún efecto. (Véase la Fig.34 para una representación gráfica de todos los puntos de tiempo y todos los grupos).

Por lo tanto, el tratamiento con el Spiegelmero de unión a SDF-1 NOX-A12-JE40, el transitorio aumento de HSC/HPC se acompañó de un aumento transitorio del recuento celular total, que conduce principalmente a números aumentados de macrófagos, granulocitos y neutrófilos y por eosinófilos. El Neupogen induce a un incremento en el recuento de células sanguíneas blancas (recuento WBC) junto con un incremento de eosinófilos [%] (véase la Fig.41).

## 10.6 Resultados de ensayos de UFC

En comparación con el vehículo (0,8 UFC/mL), todas las sustancias conducen a un aumento de los valores medios de UFCs total. Sin embargo, revNOX-A12-JE40 (6 horas) y AMD3100 (6 horas) sólo muestran efectos marginales (1,1 y 1,5 UFC/mL, respectivamente). Una inyección del Spiegelmero de unión a SDF-1 NOX-A12-JE40 conduce a tantas UFCs/mL de sangre después de 6 horas, como a las cuatro inyecciones de G-CSF (medida 48 horas después de la primera inyección y 12 horas después de la 4ª inyección) (3,7 y 3,2 UFC/mL, respectivamente). Esto es cuatro

veces el valor encontrado para el vehículo. El Spiegelmero de unión a SDF-1 NOX-A12-NO30 dobló el recuento de UFC en comparación con el vehículo (1,9 UFC/mL). Véase la Fig.35 para un resumen.

#### Ejemplo 11: Inhibición de la neovascularización coroidea (CNV)

5 Se empleó el modelo animal de “neovascularización coroidea inducida por láser” para predecir el efecto de fármacos en investigación sobre la neovascularización retiniana y coroidea. Esto aparece en enfermedades como la degeneración macular relacionada con la edad húmeda o ‘proliferativa’ (DMRE), la retinopatía diabética y la oclusión de la vena retiniana. CXCR4 ha demostrado expresarse en CNV inducida por láser (Lima e Silva et al., FASB J. 21:, 2007). Se localizó con CD45 y células que expresan F4/80 sugiriendo que estas células son macrófagos derivados de BM. Los inhibidores para CXCR4 reducen la CNV inducida por láser. Pero no se investigó si estas células expresan SDF1, también. En esta estudio se evaluó si el Spiegelmero de unión a SDF-1 NOX-A12-JE40 (SEQ. ID 132) bloquea la neovascularización.

##### 11.1 Métodos

15 Se anestesiaron y trataron con 3 quemaduras por láser por ojo a veintidós ratones C57/BL6J de no más de 12 semanas de edad. Los animales desarrollaron neovascularización coroidea en los sitios del láser. Un día después, 2 µl de una disolución del Spiegelmero de unión a SDF-1 NOX-A12-JE40 440 µM disueltos en disolución Ringer se inyectaron en un ojo de manera intravítrea (dosis: 0,88 nmol = 12,9 µg [sólo la parte oligo de la molécula] = 48 µg [molécula total que incluye PEG]) mientras que el otro ojo recibió disolución Ringer como un control. 14 días después del tratamiento láser, los animales se perfundieron con dextrano-fluoresceína, y se prepararon soportes completos de coroides. Los soportes completos se evaluaron por los cambios vasculares del coroides y del área de la membrana CNV.

20 Como un ojo de cada animal se inyectó con el Spiegelmero y el otro recibió sólo el tampón, se empleó el ensayo de clasificación de Wilcoxon que trata la diferencia entre el ojo tratado y el ojo control de cada animal. El ensayo de clasificación de Wilcoxon analiza la diferencia entre dos medidas relacionadas, en nuestro caso los ojos tratados y los ojos control de cada animal. Reconoce diferencias significativas incluso si el conjunto de ojos tratados y el conjunto de ojos control no son diferentes estadísticamente. Se empleó el siguiente dominio R: wilcoxsign\_test (V1 ~V2, datos = d0, distribución = “exacto”) p < 0,05 es significativo en el nivel 95%.

##### 11.2 Resultados

30 Se pudieron evaluar trece de los 22 ratones. La media del área de neovascularización de los ojos tratados con NOX-A12-JE40 era más pequeña que la media de los ojos tratados con disolución Ringer, indicando que el Spiegelmero reduce la formación de CNV. El valor p calculado por el ensayo de clasificación de Wilcoxon por parejas era 0,021. Por lo tanto, se concluye que el Spiegelmero de unión a SDF-1 NOX-A12-JE40 reduce significativamente la neovascularización coroidea inducida por láser en el modelo CNV de ratón, sugiriendo el beneficio terapéutico potencial (véase la Fig.36).

#### Ejemplo 12: Eficacia en nefropatía diabética

35 En glomeruloesclerosis, por ejemplo en diabetes, se mantiene como la principal causa de la enfermedad en la etapa final porque los patomecanismos dependientes de angiotensina no siempre previenen la progresión de la enfermedad. Por tanto, se requieren otras estrategias de tratamiento para añadir al arsenal terapéutico para la glomeruloesclerosis. Datos recientes de estudios experimentales relacionan la progresión de la glomeruloesclerosis en ratones y seres humanos diabéticos con inflamación intra-renal. Por ejemplo, mofetil micofenolato, metotrexato, o la irradiación reducen la excreción de la albúmina urinaria, y la glomeruloesclerosis en ratas con diabetes inducida con estreptozotocina. Pero, los mecanismos molecular y celular de inflamación intra-renal en nefropatía diabética son escasos. Los pacientes con nefropatía diabética han aumentado niveles séricos de marcadores de fase aguda de inflamación pero esto puede no representar inflamación intra-renal.

45 En este estudio se ensayó el bloqueo de inicio tardío de SDF-1 con el Spiegelmero de unión a SDF-1 NOX-A12-JE40 (SEQ. ID. 132) en ratones db/db que habían recibido una uninefrectomía a las 6 semanas de edad. La administración de NOX-A12-JE40 comenzó a los 4 meses de edad y se realizó 3 veces a la semana a la dosis de 50 mg/kg s.c (corresponde a 13,4 mg/kg de la parte del oligonucleótido). Dos meses después los animales se sacrificaron y se determinó la puntuación de la glomeruloesclerosis.

50 Pero esta puntuación, se consigue de los glomérulos individuales por infiltración de leucocitos, y por cicatrización de tejidos. Una puntuación de 0 describe un glomérulo sano, mientras que una puntuación de 4 describe la forma completamente fibrótica (Ninichuk, Clauss et al., 2008).

##### 12.2 Resultados

55 Mientras que los ratones de tipo salvaje casi no tienen daño renal a la edad de seis meses, los ratones db/db de la misma edad muestran un marcado daño renal. El daño renal en ratones db/db que fueron uninefrectomizados a la edad de seis semanas es incluso más fuerte.

El Spiegelmero de unión a SDF-1 NOX-A12-JE40 (SEQ. ID. 132), pero no el Spiegelmero control no específico revNOX-A12-JE40 (SEQ. ID. 243) de la secuencia inversa mejora significativamente el daño renal que se observó en ratones db/db con uninefrectomía después de los seis meses: Había cantidades significativamente menores de glomérulos con puntuación renal alta (3 y 4). En cambio, se observaron alteraciones más sutiles (infiltración leucocitaria) en una alta cantidad de glomérulos (véase Fig. 37).

Ejemplo 13: Spiegelmero de unión a SDF-1 NOX-A12-JE40 que inhibe la pérdida vascular retiniana inducida por VEGF en conejos pigmentados

La pérdida vascular de vasos retinianos ocurre en varias enfermedades oculares, como en la degeneración macular relacionada con la edad y en la oclusión de la vena retiniana. Esto conduce a edema macular que deteriora la visión.

### 13.1 Métodos

En un modelo animal, la pérdida vascular retiniana se puede inducir en conejos mediante una inyección de VEGF intravítrea. En este modelo, la permeabilidad de la vasculatura retiniana se mide mediante fotometría con fluoresceína 48 horas después de la inyección intravítrea de VEGF. La inyección del producto de ensayo se realizó 5 días antes del estímulo de VEGF. La permeabilidad que se observó dos días después de la administración de VEGF se considera que no está relacionada directamente al incremento de la permeabilidad que se observa de manera transitoria después del estímulo con VEGF, sino un efecto de procesos descendentes más duraderos que se desencadenan mediante inyección de VEGF (Edelman, Lutz et al, 2005).

En este estudio se emplearon ocho conejos pigmentados por grupo (Fauve de Burgogne, 2-3 meses de edad). Los grupos eran:

- 4 grupos de dosificación de NOX-A12-JE40 (105 nmol, 40 nmol, 8 nmol, 1,6 nmol)
- un subgrupo de sustancia de referencia (Kenacort retard® (acetónido de triamcinolona 4%), 2 mg i.vt) y
- vehículo (glucosa 5% por infusión).

El volumen de inyección era de 50 µL para todos los grupos. Cinco días después de la administración de la sustancia en los ojos derechos, VEGF se administró sólo en los ojos derechos: 500 ng de VEGF<sub>165</sub> humana recombinante en 50 µL de PBS. 48 horas después, se midió la permeabilidad retiniana en animales anestesiados mediante fluorometría ocular (1 hora después una inyección i.v. de fluoresceína de sodio (10% en cloruro de sodio 0,9%, 50 mg/kg)). En resumen, la intensidad de fluorescencia se analizó in vivo a lo largo del eje óptico desde la córnea hasta la retina de ambos ojos empleando un dispositivo de fluorofotometría (Fluorotron Master FM-2). Se calcularon las curvas de distribución de intensidad integradas y la proporción del área bajo la curva (AUC) resultantes del ojo tratado con respecto al ojo sin tratar. Los valores medios del grupo y las desviaciones estándar se calcularon y representaron en una gráfica.

### 13.2 Resultados

La inyección intravítrea de 105 y 40 nmol del Spiegelmero de unión a SDF-1 NOX-A12-JE40 en 50 µL de glucosa 5 días después de la inyección de VEGF<sub>165</sub> humano recombinante (500 ng en 50 µL) inhibió significativamente la permeabilización inducida por VEGF en la vasculatura retiniana 48 horas después del estímulo de VEGF. El producto de referencia triamcinolona mostró también una fuerte reducción de la permeabilidad vascular. Se han realizado previamente experimentos BiaCore que han confirmado que a las concentraciones empleadas no ocurre la unión a SDF-1 del Spiegelmero NOX-A12-JE40. Por lo tanto, se puede asumir que NOX-A12-JE40 bloquea la ruta descendente de VEGF (por ejemplo, el reclutamiento de leucocitos, pérdida de conexiones endoteliales estrechas como un efecto de la sobre-expresión de SDF-1) que conduce a la permeabilidad vascular prolongada (véase la Fig. 38). NOX-A12-JE40 puede, por lo tanto, ser útil para el tratamiento del edema macular o de retina en sí mismo o de la degeneración macular relacionada con la edad o la oclusión de la vena retiniana secundaria.

Ejemplo 14: El Spiegelmero que se une a SDF-1 NOX-A12-JE40 inhibe la angiogénesis en retinopatía inducida por oxígeno

El modelo murino de retinopatía inducida por oxígeno es un modelo para imitar la neovascularización de la retina inducida por hipoxia, como se observa en retinopatía diabética, especialmente en retinopatía diabética proliferativa, y en la degeneración macular asociada con la edad (Smith, Wesolowski et al., 1994). El modelo se refiere también como una retinopatía prematura ya que los bebés prematuros que se pusieron en incubadoras en hospitales se volvieron ciegos debido a una exposición a oxígeno demasiado alta en las incubadoras que condujo a un crecimiento anormal de los vasos retinianos durante el tiempo en la incubadora y que después volvieron a condiciones normóxicas.

### 14.1. Métodos

En el modelo murino, ratones C57BL/6J recién nacidos se incubaron en oxígeno al 75% a partir de los días P5-P12. Después de retornar al oxígeno normal los animales desarrollan neovascularización retiniana debido a la hipoxia

respectiva. El Spiegelmero de unión a SDF-1 NOX-A12-JE40 (880 ppmol en 2 µL de disolución Ringer) se inyectó el día P12. En el día P17 los ratones se perfundieron con dextrano-fluoresceína para visualizar la vasculatura retiniana. Se emplearon soportes de retina completa para evaluar los cambios de la vasculatura retiniana en un modo codificado mediante un sistema de puntuación. La perfusión de FITC-Dextrano permite sólo la evaluación de los vasos perfundidos. Para visualizar los vasos inmaduros, aún no perfundidos, las monturas enteras se tiñeron para isolectina-B4 y, por consiguiente, se analizaron bajo un microscopio de fluorescencia. Los ojos tratados con el Spiegelmero de unión a SDF-1 se compararon con los ojos tratados con el vehículo de una manera intra-individual. Se calculó la significancia mediante el ensayo de clasificación de Wilcoxon.  $p = 0,05$  corresponde al 95% de confianza.

10 Se puntuaron los siguientes parámetros:

1. número de grupos de vasos
2. tamaño del área del grupo absoluto
3. tamaño del área del grupo relativo
4. número de vasos germinados (penachos)
- 15 5. tamaño absoluto de la zona avascular
6. tamaño relativo de la zona avascular

La puntuación de la retinopatía se calculó a partir de estos parámetros sobre las imágenes de dextrano-FITC (Higgins, Yu et al., 1999). Los niveles de significancia para los parámetros y la puntuación de la retinopatía se muestran en la Fig. 40.

20 14.2 Resultados

De los 34 ratones de ensayo, se pudieron evaluar 24 monturas enteras después de la perfusión con FITC-dextrano, y se pudieron evaluar 15 después de la tinción con isolectina. Una inyección única del Spiegelmero de unión a SDF-1 NOX-A12-JE40 en el día P12 inhibe significativamente la formación del penacho y, por lo tanto, mejora la puntuación de retinopatía general como se observó en el día P17 (véanse las Figs. 39 y 40). Por lo tanto, NOX-A12-JE40 puede tener un efecto beneficioso en enfermedades con neovascularización inducida por hipoxia, especialmente en el ojo (por ejemplo, retinopatía diabética, DMRE).

### Referencias

Los datos bibliográficos completos de los documentos mencionados en la presente memoria son, si no se indica lo contrario, como sigue, por lo que la descripción de dichas referencias se incorpora en la presente memoria como referencia.

Abi-Younes, S., A. Sauty, et al. (2000). "The stromal cell-derived factor-1 chemokine is a potent platelet agonist highly expressed in atherosclerotic plaques." *Circ Res* 86(2): 131-8.

Aiuti, A., I. J. Webb, et al. (1997). "The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34+ hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34+ progenitors to peripheral blood." *J Exp Med* 185(1): 111-20.

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990), Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 215(3):403-10.

Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25(17):3389-402.

Ambati, J., A. Anand, et al. (2003). An animal model of age-related macular degeneration in senescent Ccl-2- or Ccr-2-deficient mice. *Nat Med.* 9: 1390-7.

Arya, S. K., C. C. Ginsberg, et al. (1999). "In vitro phenotype of SDF1 gene mutant that delays the onset of human immunodeficiency virus disease in vivo." *J Hum Virol* 2(3): 133-8.

Auerbach et al. (2003) Angiogenesis assays: a critical overview. *Clin.Chem.* 49: 32-40.

Avniel, S., Z. Arik, et al. (2006). "Involvement of the CXCL12/CXCR4 pathway in the recovery of skin following burns." *J Invest Dermatol* 126(2): 468-76.

Baggiolini, M. (1998). "Chemokines and leukocyte traffic." *Nature* 392(6676): 565-8.

- Baggiolini, M., B. Dewald, et al. (1994). "Interleukin-8 and related chemotactic cytokines--CXC and CC chemokines." *Adv Immunol* 55: 97-179.
- 5 Balabanian K, Lagane B, Infantino S, Chow KY, Harriague J, Moepps B, Arenzana-Seisdedos F, Thelen M, Bachelier F (2005) The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes. *J Biol Chem* 280(42): 35760-35766
- Balabanian, K., B. Lagane, et al. (2005). "WHIM syndromes with different genetic anomalies are accounted for by impaired CXCR4 desensitization to CXCL12." *Blood* 105(6): 2449-57.
- Balabanian, K., J. Couderc, et al. (2003). "Role of the chemokine stromal cell-derived factor 1 in autoantibody production and nephritis in murine lupus." *J Immunol* 170(6): 3392-400.
- 10 Balkwill, F. (2004). "Cancer and the chemokine network." *Nat Rev Cancer* 4(7): 540-50.
- Bazan, J. F., K. B. Bacon, et al. (1997). "A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif." *Nature* 385(6617): 640-4.
- Bertolini, F., C. Dell'Agnola, et al. (2002). "CXCR4 neutralization, a novel therapeutic approach for non-Hodgkin's lymphoma." *Cancer Res* 62(11): 3106-12.
- 15 Bleul, C. C., J. L. Schultze, et al. (1998). "B lymphocyte chemotaxis regulated in association with microanatomic localization, differentiation state, and B cell receptor engagement." *J Exp Med* 187(5): 753-62.
- Bleul, C. C., M. Farzan, et al. (1996). "The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry." *Nature* 382(6594): 829-33.
- 20 Bleul, C. C., R. C. Fuhlbrigge, et al. (1996). "A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1)." *J Exp Med* 184(3): 1101-9.
- Brooks, H. L., Jr., S. Caballero, Jr., et al. (2004). "Vitreous levels of vascular endothelial growth factor and stromal-derived factor 1 in patients with diabetic retinopathy and cystoid macular edema before and after intraocular injection of triamcinolone." *Arch Ophthalmol* 122(12): 1801-7.
- 25 Broxmeyer, H. E., A. Orazi, et al. (1998). "Myeloid progenitor cell proliferation and mobilization effects of BB10010, a genetically engineered variant of human macrophage inflammatory protein-1 alpha, in a phase I clinical trial in patients with relapsed/refractory breast cancer." *Blood Cells Mol Dis* 24(1): 14-30.
- Broxmeyer, H. E., L. Benninger, et al. (1995). "Effects of in vivo treatment with PIXY321 (GM-CSF/IL-3 fusion protein) on proliferation kinetics of bone marrow and blood myeloid progenitor cells in patients with sarcoma." *Exp Hematol* 23(4): 335-40.
- 30 Buckley, C. D., N. Amft, et al. (2000). "Persistent induction of the chemokine receptor CXCR4 by TGF-beta 1 on synovial T cells contributes to their accumulation within the rheumatoid synovium." *J Immunol* 165(6): 3423-9.
- Burger, J. A., N. Tsukada, et al. (2000). "Blood-derived nurse-like cells protect chronic lymphocytic leukemia B cells from spontaneous apoptosis through stromal cell-derived factor-1." *Blood* 96(8): 2655-63.
- 35 Burns JM, Summers BC, Wang Y, Melikian A, Berahovich R, Miao Z, Penfold ME, Sunshine MJ, Littman DR, Kuo CJ, Wei K, McMaster BE, Wright K, Howard MC, Schall TJ (2006) A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development. *J Exp Med* 203(9): 2201-2213
- Burt, R. K., A. Marmont, et al. (2006). "Randomized controlled trials of autologous hematopoietic stem cell transplantation for autoimmune diseases: the evolution from myeloablative to lymphoablative transplant regimens." *Arthritis Rheum* 54(12): 3750-60.
- 40 Butler JM, Guthrie SM, Koc M, Afzal A, Caballero S, Brooks HL, Mames RN, Segal MS, Grant MB, Scott EW (2005) SDF-1 is both necessary and sufficient to promote proliferative retinopathy. *J Clin Invest* 115(1): 86-93
- Butler, J. M., S. M. Guthrie, et al. (2005). "SDF-1 is both necessary and sufficient to promote proliferative retinopathy." *J Clin Invest* 115(1): 86-93.
- 45 Cabioglu, N., A. Sahin, et al. (2005). "Chemokine receptor CXCR4 expression in breast cancer as a potential predictive marker of isolated tumor cells in bone marrow." *Clin Exp Metastasis* 22(1): 39-46.
- Chow FY, Nikolic-Paterson DJ, Ma FY, Ozols E, Rollins BJ, Tesch GH (2007) Monocyte chemoattractant protein-1-induced tissue inflammation is critical for the development of renal injury but not type 2 diabetes in obese db/db mice. *Diabetologia* 50(2): 471-480

- Chow FY, Nikolic-Paterson DJ, Ozols E, Atkins RC, Rollin BJ, Tesch GH (2006) Monocyte chemoattractant protein-1 promotes the development of diabetic renal injury in streptozotocin-treated mice. *Kidney Int* 69(1): 73-80
- Corcione, A., L. Ottonello, et al. (2000). "Stromal cell-derived factor-1 as a chemoattractant for follicular center lymphoma B cells." *J Natl Cancer Inst* 92(8): 628-35.
- 5 Croop, J. M., R. Cooper, et al. (2000). "Large-scale mobilization and isolation of CD34+ cells from normal donors." *Bone Marrow Transplant* 26(12): 1271-9.
- Crump, M. P., J. H. Gong, et al. (1997). "Solution structure and basis for functional activity of stromal cell-derived factor-1; dissociation of CXCR4 activation from binding and inhibition of HIV-1." *Embo J* 16(23): 6996-7007.
- 10 Dale, D. C., W. C. Liles, et al. (1998). "Effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) on neutrophil kinetics and function in normal human volunteers." *Am J Hematol* 57(1): 7-15.
- Damha, M.J., Ogilvie, K.K.(1993) *Methods in Molecular Biology*, Vol. 20 *Protocols for oligonucleotides and analogs*, ed. S. Agrawal, p. 81-114, Humana Press Inc. 1993
- D'Apuzzo, M., A. Rolink, et al. (1997). "The chemokine SDF-1, stromal cell-derived factor 1, attracts early stage B cell precursors via the chemokine receptor CXCR4." *Eur J Immunol* 27(7): 1788-93.
- 15 Dawn B, Tiwari S, Kucia MJ, Zuba-Surma EK, Guo Y, Sanganalmath SK, Abdel-Latif A, Hunt G, Vincent RJ, Taher H, Reed NJ, Ratajczak MZ, Bolli R (2008) Transplantation of bone marrow-derived very small embryonic-like stem cells attenuates left ventricular dysfunction and remodeling after myocardial infarction. *Stem Cells* 26(6): 1646-1655
- De Klerck, B., L. Geboes, et al. (2005). "Pro-inflammatory properties of stromal cell-derived factor-1 (CXCL12) in collagen-induced arthritis." *Arthritis Res Ther* 7(6): R1208-20.
- 20 Eaton, B. E., L. Gold, et al. (1997). "Post-SELEX combinatorial optimization of aptamers." *Bioorg Med Chem* 5(6): 1087-96.
- Edelman JL, Lutz D, Castro MR (2005) Corticosteroids inhibit VEGF-induced vascular leakage in a rabbit model of blood-retinal and blood-aqueous barrier breakdown. *Exp Eye Res* 80(2): 249-258
- 25 Edelman, J. L., D. Lutz, et al. (2005). "Corticosteroids inhibit VEGF-induced vascular leakage in a rabbit model of blood-retinal and blood-aqueous barrier breakdown." *Exp Eye Res* 80(2): 249-58.
- Fedyk, E. R., D. H. Ryan, et al. (1999). "Maturation decreases responsiveness of human bone marrow B lineage cells to stromal-derived factor 1 (SDF-1)." *J Leukoc Biol* 66(4): 667-73.
- Fedyk, E. R., D. Jones, et al. (2001). "Expression of stromal-derived factor-1 is decreased by IL-1 and TNF and in dermal wound healing." *J Immunol* 166(9): 5749-54.
- 30 Fierro, F. A., S. Brenner, et al. (2008). "Combining SDF-1/CXCR4 antagonism and chemotherapy in relapsed acute myeloid leukemia." *Leukemia*.
- Fong, D. S., L. P. Aiello, et al. (2004). "Diabetic retinopathy." *Diabetes Care* 27(10): 2540-53.
- Fransoli J, Bailey B, Gude NA, Cottage CT, Muraski JA, Emmanuel G, Wu W, Alvarez R, Rubio M, Ottolenghi S, Schaefer E, Sussman MA (2008) Evolution of the c-kit-positive cell response to pathological challenge in the myocardium. *Stem Cells* 26(5): 1315-1324
- 35 Friedlander M, Dorrell MI, Ritter MR, Marchetti V, Moreno SK, El-Kalay M, Bird AC, Banin E, Aguilar E (2007) Progenitor cells and retinal angiogenesis. *Angiogenesis* 10(2): 89-101
- Garrido, S. M., F. R. Appelbaum, et al. (2001). "Acute myeloid leukemia cells are protected from spontaneous and drug-induced apoptosis by direct contact with a human bone marrow stromal cell line (HS-5)." *Exp Hematol* 29(4): 448-57.
- 40 Gear, A. R., S. Suttitanamongkol, et al. (2001). "Adenosine diphosphate strongly potentiates the ability of the chemokines MDC, TARC, and SDF-1 to stimulate platelet function." *Blood* 97(4): 937-45.
- Geminder, H., O. Sagi-Assif, et al. (2001). "A possible role for CXCR4 and its ligand, the CXC chemokine stromal cell-derived factor-1, in the development of bone marrow metastases in neuroblastoma." *J Immunol* 167(8): 4747-57.
- 45 Glaspy, J. A., E. J. Shpall, et al. (1997). "Peripheral blood progenitor cell mobilization using stem cell factor in combination with filgrastim in breast cancer patients." *Blood* 90(8): 2939-51.
- Glaspy, J., M. W. Davis, et al. (1996). "Biology and clinical potential of stem-cell factor." *Cancer Chemother Pharmacol* 38 Suppl: S53-7.

- Godessart, N. (2005). "Chemokine receptors: attractive targets for drug discovery." *Ann N Y Acad Sci* 1051: 647-57.
- Godot, V., M. Arock, et al. (2007). "H4 histamine receptor mediates optimal migration of mast cell precursors to CXCL12." *J Allergy Clin Immunol* 120(4): 827-34.
- 5 Gombert, M., M. C. Dieu-Nosjean, et al. (2005). "CCL1-CCR8 interactions: an axis mediating the recruitment of T cells and Langerhans-type dendritic cells to sites of atopic skin inflammation." *J Immunol* 174(8): 5082-91.
- Gonzalo, J. A., C. M. Lloyd, et al. (2000). "Critical involvement of the chemotactic axis CXCR4/stromal cell-derived factor-1 alpha in the inflammatory component of allergic airway disease." *J Immunol* 165(1): 499-508.
- Grassi, F., S. Cristino, et al. (2004). "CXCL12 chemokine up-regulates bone resorption and MMP-9 release by human osteoclasts: CXCL12 levels are increased in synovial and bone tissue of rheumatoid arthritis patients." *J Cell Physiol* 199(2): 244-51.
- 10 Gratwohl A, Baldomero H, Horisberger B, Schmid C, Passweg J, Urbano-Ispizua A (2002) Current trends in hematopoietic stem cell transplantation in Europe. *Blood* 100(7): 2374-2386
- Grunewald, M., I. Avraham, et al. (2006). "VEGF-induced adult neovascularization: recruitment, retention, and role of accessory cells." *Cell* 124(1): 175-89.
- 15 Gu, J., E. Marker-Hermann, et al. (2002). "A 588-gene microarray analysis of the peripheral blood mononuclear cells of spondyloarthritis patients." *Rheumatology (Oxford)* 41(7): 759-66.
- Guleng, B., K. Tateishi, et al. (2005). "Blockade of the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 axis attenuates in vivo tumor growth by inhibiting angiogenesis in a vascular endothelial growth factor-independent manner." *Cancer Res* 65(13): 5864-71.
- 20 Gulino, A. V., D. Moratto, et al. (2004). "Altered leukocyte response to CXCL12 in patients with warts hypogammaglobulinemia, infections, myelokathexis (WHIM) syndrome." *Blood* 104(2): 444-52.
- Hartmann, T. N., M. Burger, et al. (2004). "The role of adhesion molecules and chemokine receptor CXCR4 (CD184) in small cell lung cancer." *J Biol Regul Homeost Agents* 18(2): 126-30.
- Higgins, R. D., K. Yu, et al. (1999). "Diltiazem reduces retinal neovascularization in a mouse model of oxygen induced retinopathy." *Curr Eye Res* 18(1): 20-7.
- 25 Hodohara, K., N. Fujii, et al. (2000). "Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) acts together with thrombopoietin to enhance the development of megakaryocytic progenitor cells (CFU-MK)." *Blood* 95(3): 769-75.
- Hoshino, M., N. Aoike, et al. (2003). "Increased immunoreactivity of stromal cell-derived factor-1 and angiogenesis in asthma." *Eur Respir J* 21(5): 804-9.
- 30 Hwang, J. H., H. K. Chung, et al. (2003). "CXC chemokine receptor 4 expression and function in human anaplastic thyroid cancer cells." *J Clin Endocrinol Metab* 88(1): 408-16.
- Ito T, Suzuki A, Imai E, Okabe M, Hori M (2001) Bone marrow is a reservoir of repopulating mesangial cells during glomerular remodeling. *J Am Soc Nephrol* 12(12): 2625-2635
- 35 Iwamoto T, Okamoto H, Toyama Y, Momohara S (2008) Molecular aspects of rheumatoid arthritis: chemokines in the joints of patients. *FEBS J*
- Jackson, K. A., S. M. Majka, et al. (2001). "Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells." *J Clin Invest* 107(11): 1395-402.
- Jiang, W., P. Zhou, et al. (1994). "Molecular cloning of TPAR1, a gene whose expression is repressed by the tumor promoter 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA)." *Exp Cell Res* 215(2): 284-93.
- 40 Jin, L., K. J. Hope, et al. (2006). "Targeting of CD44 eradicates human acute myeloid leukemic stem cells." *Nat Med* 12(10): 1167-74.
- Jin, L., Y. Tabe, et al. (2008). "CXCR4 up-regulation by imatinib induces chronic myelogenous leukemia (CML) cell migration to bone marrow stroma and promotes survival of quiescent CML cells." *Mol Cancer Ther* 7(1): 48-58.
- 45 Jo, D. Y., S. Rafii, et al. (2000). "Chemotaxis of primitive hematopoietic cells in response to stromal cell-derived factor-1." *J Clin Invest* 105(1): 101-11.
- Jose, P. J., D. A. Griffiths-Johnson, et al. (1994). "Eotaxin: a potent eosinophil chemoattractant cytokine detected in a guinea pig model of allergic airways inflammation." *J Exp Med* 179(3): 881-7.

- Juarez, J. and L. Bendall (2004). "SDF-1 and CXCR4 in normal and malignant hematopoiesis." *Histol Histopathol* 19(1): 299-309.
- Kanbe, K., K. Takagishi, et al. (2002). "Stimulation of matrix metalloprotease 3 release from human chondrocytes by the interaction of stromal cell-derived factor 1 and CXC chemokine receptor 4." *Arthritis Rheum* 46(1): 130-7.
- 5 Kang, H., G. Watkins, et al. (2005). "Stromal cell derived factor-1: its influence on invasiveness and migration of breast cancer cells in vitro, and its association with prognosis and survival in human breast cancer." *Breast Cancer Res* 7(4): R402-10.
- Kawai, T., U. Choi, et al. (2005). "Enhanced function with decreased internalization of carboxy-terminus truncated CXCR4 responsible for WHIM syndrome." *Exp Hematol* 33(4): 460-8.
- 10 Kim KW, Cho ML, Kim HR, Ju JH, Park MK, Oh HJ, Kim JS, Park SH, Lee SH, Kim HY (2007) Up-regulation of stromal cell-derived factor 1 (CXCL12) production in rheumatoid synovial fibroblasts through interactions with T lymphocytes: role of interleukin-17 and CD40L-CD40 interaction. *Arthritis Rheum* 56(4): 1076-1086
- King, A. G., D. Horowitz, et al. (2001). "Rapid mobilization of murine hematopoietic stem cells with enhanced engraftment properties and evaluation of hematopoietic progenitor cell mobilization in rhesus monkeys by a single injection of SB-251353, a specific truncated form of the human CXC chemokine GRObeta." *Blood* 97(6): 1534-42.
- 15 Kocher, A. A., M. D. Schuster, et al. (2001). "Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function." *Nat Med* 7(4): 430-6.
- Koshiba, T., R. Hosotani, et al. (2000). "Expression of stromal cell-derived factor 1 and CXCR4 ligand receptor system in pancreatic cancer: a possible role for tumor progression." *Clin Cancer Res* 6(9): 3530-5.
- 20 Krumbholz, M., D. Theil, et al. (2006). "Chemokines in multiple sclerosis: CXCL12 and CXCL13 up-regulation is differentially linked to CNS immune cell recruitment." *Brain* 129: 200-211.
- Kryczek, I., A. Lange, et al. (2005). "CXCL12 and vascular endothelial growth factor synergistically induce neoangiogenesis in human ovarian cancers." *Cancer Res* 65(2): 465-72.
- 25 Kucia, M., R. Reza, et al. (2005). "Trafficking of normal stem cells and metastasis of cancer stem cells involve similar mechanisms: pivotal role of the SDF-1-CXCR4 axis." *Stem Cells* 23(7): 879-94.
- Kulkarni O, Pawar RD, Purschke W, Eulberg D, Selve N, Buchner K, Ninichuk V, Segerer S, Vielhauer V, Klusmann S, Anders HJ (2007) Spiegelmer inhibition of CCL2/MCP-1 ameliorates lupus nephritis in MRL-(Fas)lpr mice. *J Am Soc Nephrol* 18(8): 2350-2358
- 30 Kusser, W. (2000). "Chemically modified nucleic acid aptamers for in vitro selections: evolving evolution." *J Biotechnol* 74(1): 27-38.
- Lagane, B., K. Y. Chow, et al. (2008). "CXCR4 dimerization and {beta}-arrestin-mediated signaling account for the enhanced chemotaxis to CXCL12 in WHIM syndrome." *Blood*.
- 35 Lapteva, N., A. G. Yang, et al. (2005). "CXCR4 knockdown by small interfering RNA abrogates breast tumor growth in vivo." *Cancer Gene Ther* 12(1): 84-9.
- Li JK, Yu L, Shen Y, Zhou LS, Wang YC, Zhang JH (2008) Inhibition of CXCR4 activity with AMD3100 decreases invasion of human colorectal cancer cells in vitro. *World J Gastroenterol* 14(15): 2308-2313
- Li Y, Atmaca-Sonmez P, Schanle CL, Ildstad ST, Kaplan HJ, Enzmann V (2007) Endogenous bone marrow derived cells express retinal pigment epithelium cell markers and migrate to focal areas of RPE damage. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48(9): 4321-4327
- 40 Li Y, Reza RG, Atmaca-Sonmez P, Ratajczak MZ, Ildstad ST, Kaplan HJ, Enzmann V (2006) Retinal pigment epithelium damage enhances expression of chemoattractants and migration of bone marrow-derived stem cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47(4): 1646-1652
- Liang Z, Brooks J, Willard M, Liang K, Yoon Y, Kang S, Shim H (2007) CXCR4/CXCL12 axis promotes VEGF-mediated tumor angiogenesis through Akt signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 359(3): 716-722
- 45 Lima e Silva R, Shen J, Hackett SF, Kachi S, Akiyama H, Kiuchi K, Yokoi K, Hatara MC, Lauer T, Aslam S, Gong YY, Xiao WH, Khu NH, Thut C, Campochiaro PA (2007) The SDF-1/CXCR4 ligand/receptor pair is an important contributor to several types of ocular neovascularization. *FASEB J* 21(12): 3219-3230
- 50 Ma, Q., D. Jones, et al. (1998). "Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(16): 9448-53.

- Maekawa, T. and T. Ishii (2000). "Chemokine/receptor dynamics in the regulation of hematopoiesis." *Intern Med* 39(2): 90-100.
- Majka M, Kucia M, Ratajczak MZ (2005) Stem cell biology - a never ending quest for understanding. *Acta Biochim Pol* 52(2): 353-358
- 5 Majka, M., A. Janowska-Wieczorek, et al. (2000). "Stromal-derived factor 1 and thrombopoietin regulate distinct aspects of human megakaryopoiesis." *Blood* 96(13): 4142-51.
- Mames RN, Mattheus A, Butler J, Brown G, Jorgensen M, Scott E (2006). New anti SDF-1 antinody prevents retinal neovascularization in primates. *ARVO*; May 1, 2006; Fort Lauderdale.
- 10 Marechal, V., F. Arenzana-Seisdedos, et al. (1999). "Opposite effects of SDF-1 on human immunodeficiency virus type 1 replication." *J Virol* 73(5): 3608-15.
- Matsunaga, T., N. Takemoto, et al. (2003). "Interaction between leukemic-cell VLA-4 and stromal fibronectin is a decisive factor for minimal residual disease of acute myelogenous leukemia." *Nat Med* 9(9): 1158-65.
- 15 Matthys, P., S. Hatse, et al. (2001). "AMD3100, a potent and specific antagonist of the stromal cell-derived factor-1 chemokine receptor CXCR4, inhibits autoimmune joint inflammation in IFN-gamma receptor-deficient mice." *J Immunol* 167(8): 4686-92.
- McGinnis S, Madden TL (2004). BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 32(Web Server issue):W20-5.
- Meleth, A. D., E. Agron, et al. (2005). "Serum inflammatory markers in diabetic retinopathy." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46(11): 4295-301.
- 20 Menu, E., K. Asosingh, et al. (2006). "The involvement of stromal derived factor 1alpha in homing and progression of multiple myeloma in the 5TMM model." *Haematologica*.
- Miller, M. D. and M. S. Krangel (1992). "Biology and biochemistry of the chemokines: a family of chemotactic and inflammatory cytokines." *Crit Rev Immunol* 12(1-2): 17-46.
- 25 Minges Wols HA, Ippolito JA, Yu Z, Palmer JL, White FA, Le PT, Witte PL (2007) The effects of microenvironment and internal programming on plasma cell survival. *Int Immunol* 19(7): 837-846
- Minges Wols HA, Witte PL (2008) Plasma cell purification from murine bone marrow using a two-step isolation approach. *J Immunol Methods* 329(1-2): 219-224
- Moser, B., M. Wolf, et al. (2004). "Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control." *Trends Immunol* 25(2): 75-84.
- 30 Mudry, R. E., J. E. Fortney, et al. (2000). "Stromal cells regulate survival of B-lineage leukemic cells during chemotherapy." *Blood* 96(5): 1926-32.
- Muller, A., B. Homey, et al. (2001). "Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis." *Nature* 410(6824): 50-6.
- Murdoch, C. (2000). "CXCR4: chemokine receptor extraordinaire." *Immunol Rev* 177: 175-84.
- 35 Murphy, P. M., M. Baggiolini, et al. (2000). "International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors." *Pharmacol Rev* 52(1): 145-76.
- Nagasawa, T. (2000). "A chemokine, SDF-1/PBSF, and its receptor, CXC chemokine receptor 4, as mediators of hematopoiesis." *Int J Hematol* 72(4): 408-11.
- 40 Nagasawa, T., H. Kikutani, et al. (1994). "Molecular cloning and structure of a pre-B-cell growth-stimulating factor." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(6): 2305-9.
- Nagasawa, T., S. Hirota, et al. (1996). "Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1." *Nature* 382(6592): 635-8.
- NCI. (2001) Bone Marrow Transplantation and Peripheral Blood Stem Cell Transplantation: Questions and Answers. Fact Sheet, Vol. 2008.
- 45 Needleman & Wunsch (1970), A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *J Mol Biol.* 48(3):443-53.

- Ninichuk, V., S. Clauss, et al. (2008). "Late onset of Ccl2 blockade with the Spiegelmer mNOX-E36-3'PEG prevents glomerulosclerosis and improves glomerular filtration rate in db/db mice." *Am J Pathol* 172(3): 628-37.
- Oppenheim, J. J., C. O. Zachariae, et al. (1991). "Properties of the novel proinflammatory supergene "intercrine" cytokine family." *Annu Rev Immunol* 9: 617-48.
- 5 Orimo, A., P. B. Gupta, et al. (2005). "Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion." *Cell* 121(3): 335-48.
- Otani A, Kinder K, Ewalt K, Otero FJ, Schimmel P, Friedlander M (2002) Bone marrow-derived stem cells target retinal astrocytes and can promote or inhibit retinal angiogenesis. *Nat Med* 8(9): 1004-1010
- 10 Parretta, E., G. Cassese, et al. (2005), "CD8 cell division maintaining cytotoxic memory occurs predominantly in the bone marrow." *J Immunol* 174(12): 7654-64.
- Pearson & Lipman (1988), Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85: 2444
- Peled, A., I. Petit, et al. (1999). "Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4." *Science* 283(5403): 845-8.
- 15 Perissinotto, E., G. Cavalloni, et al. (2005). "Involvement of chemokine receptor 4/stromal cell-derived factor 1 system during osteosarcoma tumor progression." *Clin Cancer Res* 11(2 Pt 1): 490-7.
- Phillips, R. J., M. D. Burdick, et al. (2003). "The stromal derived factor-1/CXCL12-CXC chemokine receptor 4 biological axis in non-small cell lung cancer metastases." *Am J Respir Crit Care Med* 167(12): 1676-86.
- Ponath, P. D., S. Qin, et al. (1996). "Cloning of the human eosinophil chemoattractant, eotaxin. Expression, receptor binding, and functional properties suggest a mechanism for the selective recruitment of eosinophils." *J Clin Invest* 20 97(3): 604-12.
- Ponomaryov, T., A. Peled, et al. (2000). "Induction of the chemokine stromal-derived factor-1 following DNA damage improves human stem cell function." *J Clin Invest* 106(11): 1331-9.
- Pruijt, J. F., R. Willemze, et al. (1999). "Mechanisms underlying hematopoietic stem cell mobilization induced by the CXC chemokine interleukin-8." *Curr Opin Hematol* 6(3): 152-8.
- 25 Radbruch, A., G. Muehlinghaus, et al. (2006). "Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell." *Nat Rev Immunol* 6(10): 741-50.
- Reddy, K., Z. Zhou, et al. (2008). "Stromal cell-derived factor-1 stimulates vasculogenesis and enhances Ewing's sarcoma tumor growth in the absence of vascular endothelial growth factor." *Int J Cancer*.
- 30 Riviere, C., F. Subra, et al. (1999). "Phenotypic and functional evidence for the expression of CXCR4 receptor during megakaryocytopoiesis." *Blood* 93(5): 1511-23.
- Rosenfeld, C. S., B. Bolwell, et al. (1996). "Comparison of four cytokine regimens for mobilization of peripheral blood stem cells: IL-3 alone and combined with GM-CSF or G-CSF." *Bone Marrow Transplant* 17(2): 179-83.
- Rubin, J. B., A. L. Kung, et al. (2003). "A small-molecule antagonist of CXCR4 inhibits intracranial growth of primary brain tumors." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(23): 13513-8.
- 35 Salcedo R, Wasserman K, Young HA, Grimm MC, Howard OM, Anver MR, Kleinman HK, Murphy WJ, Oppenheim JJ (1999) Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor induce expression of CXCR4 on human endothelial cells: In vivo neovascularization induced by stromal-derived factor-1alpha. *Am J Pathol* 154(4): 1125-1135
- Salcedo, R. and J. J. Oppenheim (2003). "Role of chemokines in angiogenesis: CXCL12/SDF-1 and CXCR4 interaction, a key regulator of endothelial cell responses." *Microcirculation* 10(3-4): 359-70.
- 40 Salcedo, R., K. Wasserman, et al. (1999). "Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor induce expression of CXCR4 on human endothelial cells: In vivo neovascularization induced by stromal-derived factor-1 alpha." *Am J Pathol* 154(4): 1125-35.
- Salvucci, O., L. Yao, et al. (2002). "Regulation of endothelial cell branching morphogenesis by endogenous chemokine stromal-derived factor-1." *Blood* 99(8): 2703-11.
- 45 Saur, D., B. Seidler, et al. (2005). "CXCR4 expression increases liver and lung metastasis in a mouse model of pancreatic cancer." *Gastroenterology* 129(4): 1237-50.
- Schall, T. J. and K. B. Bacon (1994). "Chemokines, leukocyte trafficking, and inflammation." *Curr Opin Immunol* 6(6): 865-73.

- Schober, A. and A. Zerneck (2007). "Chemokines in vascular remodeling." *Thromb Haemost* 97(5): 730-7.
- Schwartz S, Litwak S, Hao W, Bahr M, Weise J, Neumann H (2008) Hematopoietic Stem Cells Reduce Postischemic Inflammation and Ameliorate Ischemic Brain Injury. *Stroke*
- 5 Scotton CJ, Wilson JL, Scott K, Stamp G, Wilbanks GD, Fricker S, Bridger G, Balkwill FR (2002) Multiple actions of the chemokine CXCL12 on epithelial tumor cells in human ovarian cancer. *Cancer Res* 62(20): 5930-5938
- Scotton, C. J., J. L. Wilson, et al. (2002). "Multiple actions of the chemokine CXCL12 on epithelial tumor cells in human ovarian cancer." *Cancer Res* 62(20): 5930-8.
- Sengupta, N., S. Caballero, et al. (2005). "Preventing stem cell incorporation into choroidal neovascularization by targeting homing and attachment factors." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46(1): 343-8.
- 10 Shirozu, M., T. Nakano, et al. (1995). "Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene." *Genomics* 28(3): 495-500.
- Smith & Waterman (1981), *Adv. Appl. Math.* 2: 482
- Smith, L. E., E. Wesolowski, et al. (1994). "Oxygen-induced retinopathy in the mouse." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35(1): 101-11.
- 15 Soriano, A., C. Martinez, et al. (2002). "Plasma stromal cell-derived factor (SDF)-1 levels, SDF1-3'A genotype, and expression of CXCR4 on T lymphocytes: their impact on resistance to human immunodeficiency virus type 1 infection and its progression." *J Infect Dis* 186(7): 922-31.
- Springer, T. A. (1995). "Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration." *Annu Rev Physiol* 57: 827-72.
- 20 Stem Cells: Scientific Progress and Future Research Directions. Department of Health and Human Services. June 2001. <<http://stemcells.nih.gov/info/scireport/2001report>>.
- Sun, Y. X., A. Schneider, et al. (2005). "Skeletal localization and neutralization of the SDF-1(CXCL12)/CXCR4 axis blocks prostate cancer metastasis and growth in osseous sites in vivo." *J Bone Miner Res* 20(2): 318-29.
- 25 Tabe, Y., L. Jin, et al. (2007). "Activation of integrin-linked kinase is a critical prosurvival pathway induced in leukemic cells by bone marrow-derived stromal cells." *Cancer Res* 67(2): 684-94.
- Tachibana, K., S. Hirota, et al. (1998). "The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract." *Nature* 393(6685): 591-4.
- Takenaga, M., H. Tamamura, et al. (2004). "A single treatment with microcapsules containing a CXCR4 antagonist suppresses pulmonary metastasis of murine melanoma." *Biochem Biophys Res Commun* 320(1): 226-32.
- 30 Tamamura, H., M. Fujisawa, et al. (2004). "Identification of a CXCR4 antagonist, a T140 analog, as an anti-rheumatoid arthritis agent." *FEBS Lett* 569(1-3): 99-104.
- Tang Y, Yasuhara T, Hara K, Matsukawa N, Maki M, Yu G, Xu L, Hess DC, Borlongan CV (2007) Transplantation of bone marrow-derived stem cells: a promising therapy for stroke. *Cell Transplant* 16(2): 159-169
- 35 Tarlinton D, Radbruch A, Hiepe F, Dorner T (2008) Plasma cell differentiation and survival. *Curr Opin Immunol* 20(2): 162-169
- Tashiro, K., H. Tada, et al. (1993). "Signal sequence trap: a cloning strategy for secreted proteins and type I membrane proteins." *Science* 261(5121): 600-3.
- Vadhan-Raj, S., L. J. Murray, et al. (1997). "Stimulation of megakaryocyte and platelet production by a single dose of recombinant human thrombopoietin in patients with cancer." *Ann Intern Med* 126(9): 673-81.
- 40 Venkatesan, N., S. J. Kim, et al. (2003). "Novel phosphoramidite building blocks in synthesis and applications toward modified oligonucleotides." *Curr Med Chem* 10(19): 1973-91.
- Viardot, A., R. Kronenwett, et al. (1998). "The human immunodeficiency virus (HIV)-type 1 coreceptor CXCR-4 (fusin) is preferentially expressed on the more immature CD34+ hematopoietic stem cells." *Ann Hematol* 77(5): 193-7.
- 45 Voermans, C., M. L. Kooi, et al. (2001). "In vitro migratory capacity of CD34+ cells is related to hematopoietic recovery after autologous stem cell transplantation." *Blood* 97(3): 799-804.
- Wang J, Shiozawa Y, Wang Y, Jung Y, Pienta KJ, Mehra R, Loberg R, Taichman RS (2008) The role of CXCR7/RDC1 as a chemokine receptor for CXCL12/SDF-1 in prostate cancer. *J Biol Chem* 283(7): 4283-4294

- Wang, J., E. Guan, et al. (2001). "Role of tyrosine phosphorylation in ligand-independent sequestration of CXCR4 in human primary monocytes-macrophages." *J Biol Chem* 276(52): 49236-43.
- Wang, N., Q. L. Wu, et al. (2005). "Expression of chemokine receptor CXCR4 in nasopharyngeal carcinoma: pattern of expression and correlation with clinical outcome." *J Transl Med* 3: 26.
- 5 Wijdenes J, Vooijs WC, Clement C, Post J, Morard F, Vita N, Laurent P, Sun RX, Klein B, Dore JM (1996) A plasmocyte selective monoclonal antibody (B-B4) recognizes syndecan-1. *Br J Haematol* 94(2): 318-323
- Wincott F, DiRenzo A, Shaffer C, Grimm S, Tracz D, Workman C, Sweedler D, Gonzalez C, Scaringe S, Usman N (1995). Synthesis, deprotection, analysis and purification of RNA and ribozymes. *Nucleic Acids Res.* 23(14):2677-84.
- 10 Xu, J., A. Mora, et al. (2007). "Role of the SDF-1/CXCR4 axis in the pathogenesis of lung injury and fibrosis." *Am J Respir Cell Mol Biol* 37(3): 291-9.
- Yamaguchi, J., K. F. Kusano, et al. (2003). "Stromal cell-derived factor-1 effects on ex vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization." *Circulation* 107(9): 1322-8.
- Yamaji-Kegan, K., Q. Su, et al. (2006). "Hypoxia-induced mitogenic factor has proangiogenic and proinflammatory effects in the lung via VEGF and VEGF receptor-2." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 291(6): L1159-68.
- 15 Yang J, Zhang B, Lin Y, Yang Y, Liu X, Lu F (2008) Breast cancer metastasis suppressor 1 inhibits SDF-1alpha-induced migration of non-small cell lung cancer by decreasing CXCR4 expression. *Cancer Lett*
- Yasumoto, K., K. Koizumi, et al. (2006). "Role of the CXCL12/CXCR4 axis in peritoneal carcinomatosis of gastric cancer." *Cancer Res* 66(4): 2181-7.
- 20 Zagzag D, Esencay M, Mendez O, Yee H, Smirnova I, Huang Y, Chiriboga L, Lukyanov E, Liu M, Newcomb EW (2008) Hypoxia- and vascular endothelial growth factor-induced stromal cell-derived factor-1 alpha/CXCR4 expression in glioblastomas: one plausible explanation of Scherer's structures. *Am J Pathol* 173(2): 545-560
- Zeelenberg, I. S., L. Ruuls-Van Stalle, et al. (2001). "Retention of CXCR4 in the endoplasmic reticulum blocks dissemination of a T cell hybridoma." *J Clin Invest* 108(2): 269-77.
- 25 Zeelenberg, I. S., L. Ruuls-Van Stalle, et al. (2003). "The chemokine receptor CXCR4 is required for outgrowth of colon carcinoma micrometastases." *Cancer Res* 63(13): 3833-9.
- Zhang, X., T. Nakajima, et al. (2005). "Tissue trafficking patterns of effector memory CD4+ T cells in rheumatoid arthritis." *Arthritis Rheum* 52(12): 3839-49.
- Zhou, Y., P. H. Larsen, et al. (2002). "CXCR4 is a major chemokine receptor on glioma cells and mediates their survival." *J Biol Chem* 277(51): 49481-7.
- 30 Zou, Y. R., A. H. Kottmann, et al. (1998). "Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development." *Nature* 393(6685): 595-9.

**Listado de secuencias**

- <110> NOXXON Pharma AG
- 35 <120> Ácidos nucleicos de unión a SDF-1 y el uso de los mismos<130> N 10073 PCT
- <130> N 10073 PCT
- <160> 241
- 40 <170> PatentIn versión 3.1
- <210> 1
- <211> 68
- 45 <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 1

ES 2 768 051 T3

Lys Pro Val Ser Leu Ser Tyr Arg Cys Pro Cys Arg Phe Phe Glu Ser  
1 5 10 15

His Val Ala Arg Ala Asn Val Lys His Leu Lys Ile Leu Asn Thr Pro  
20 25 30

Asn Cys Ala Leu Gln Ile Val Ala Arg Leu Lys Asn Asn Asn Arg Gln  
35 40 45

Val Cys Ile Asp Pro Lys Leu Lys Trp Ile Gln Glu Tyr Leu Glu Lys  
50 55 60

Ala Leu Asn Lys  
65

<210> 2  
<211> 72  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

5

<400> 2  
Lys Pro Val Ser Leu Ser Tyr Arg Cys Pro Cys Arg Phe Phe Glu Ser  
1 5 10 15

His Val Ala Arg Ala Asn Val Lys His Leu Lys Ile Leu Asn Thr Pro  
20 25 30

Asn Cys Ala Leu Gln Ile Val Ala Arg Leu Lys Asn Asn Asn Arg Gln  
35 40 45

Val Cys Ile Asp Pro Lys Leu Lys Trp Ile Gln Glu Tyr Leu Glu Lys  
50 55 60

Ala Leu Asn Lys Arg Phe Lys Met  
65 70

10

<210> 3  
<211> 68  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

15

<400> 3  
Lys Pro Val Ser Leu Ser Tyr Arg Cys Pro Cys Arg Phe Phe Glu Ser  
1 5 10 15

His Ile Ala Arg Ala Asn Val Lys His Leu Lys Ile Leu Asn Thr Pro  
20 25 30

Asn Cys Ala Leu Gln Ile Val Ala Arg Leu Lys Asn Asn Asn Arg Gln  
35 40 45

Val Cys Ile Asp Pro Lys Leu Lys Trp Ile Gln Glu Tyr Leu Glu Lys  
50 55 60

Ala Leu Asn Lys  
65

20

<210> 4  
<211> 71

ES 2 768 051 T3

<212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 5 <221> característica miscelánea  
 <222> (1)..(71)  
 <223> D-péptido

<220>  
 10 <221> característica miscelánea  
 <222> (71)..(71)  
 <223> biotilada

<400> 4  
 Lys Pro Val Ser Leu Ser Tyr Arg Cys Pro Cys Arg Phe Phe Glu Ser  
 1 5 10 15  
 His Val Ala Arg Ala Asn Val Lys His Leu Lys Ile Leu Asn Thr Pro  
 20 25 30  
 Asn Cys Ala Leu Gln Ile Val Ala Arg Leu Lys Asn Asn Asn Arg Gln  
 35 40 45  
 Val Cys Ile Asp Pro Lys Leu Lys Trp Ile Gln Glu Tyr Leu Glu Lys  
 50 55 60

<210> 5  
 <211> 38  
 <212> ARN  
 15 Ala Leu Asn Lys Arg Phe Lys  
 65 70

<210> 5  
 <211> 38  
 <212> ARN  
 20 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> sintético

<220>  
 25 <221> característica miscelánea  
 <222> (1)..(38)  
 <223> L-ARN

<400> 5  
 gcugugaaag caacauguca augaaaggua gccgcagc 38

<210> 6  
 <211> 38  
 <212> ARN  
 35 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> sintético

<220>  
 40 <221> característica miscelánea  
 <222> (1)..(38)  
 <223> L-ARN

<400> 6  
 gcugugaaag uaacauguca augaaaggua accacagc 38

<210> 7  
 <211> 38

<212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 5 <223> sintético  
  
 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (1)..(38)  
 10 <223> L-ARN  
  
 <400> 7  
 gcugugaaag uaacacguca augaaaggua accgcagc 38  
  
 15 <210> 8  
 <211> 38  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 20 <220>  
 <223> sintético  
  
 <220>  
 <221> L-ARN  
 25 <222> (1)..(38)  
 <223>  
  
 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 30 <222> (1)..(38)  
 <223> L-ARN  
  
 <400> 8  
 gcugugaaag uaacacguca augaaaggua accacagc 38  
 35  
 <210> 9  
 <211> 38  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 40  
 <220>  
 <223> sintético  
  
 <220>  
 <221> L-ARN  
 45 <222> (1)..(38)  
 <223>  
  
 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 50 <222> (1)..(38)  
 <223> L-ARN  
  
 <400> 9  
 55 gcuguaaaag uaacauguca augaaaggua acuacagc 38  
  
 <210> 10  
 <211> 38  
 <212> ARN  
 60 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <221> L-ARN  
 <222> (1)..(38)  
 65 <223>

<220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (1)..(38)  
 <223> L-ARN  
 5  
 <400> 10  
 gcuguaaaag uaacaaguca augaaaggua acuacagc 38  
 <210> 11  
 10 <211> 38  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 15 <223> sintético  
 <220>  
 <221> L-ARN  
 <222> (1)..(38)  
 20 <223>  
 <400> 11  
 gcugugaaag uaacaaguca augaaaggua accacagc 38  
 25 <210> 12  
 <211> 38  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 30 <220>  
 <223> sintético  
 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 35 <222> (1)..(38)  
 <223> L-ARN  
 <400> 12  
 40 gcagugaaag uaacauguca augaaaggua accacagc 38  
 <210> 13  
 <211> 38  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 45 <220>  
 <223> sintético  
 <220>  
 <221> L-ARN  
 <222> (1)..(38)  
 <223>  
 50 <400> 13  
 55 gcugugaaag uaacauguca augaaaggua accacugc 38  
 <210> 14  
 <211> 38  
 <212> ARN  
 60 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> sintético  
 65 <220>  
 <221> característica miscelánea

	<222> (1)..(38)	
	<223> L-ARN	
	<400> 14	
5	gcuauaagaaag uaacauguca augaaaggua accauagc	38
	<210> 15	
	<211> 38	
	<212> ARN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> sintético	
	<220>	
15	<221> característica miscelánea	
	<222> (1)..(38)	
	<223> L-ARN	
	<400> 15	
20	gcugcgaaag cgacauguca augaaaggua gccgcagc	38
	<210> 16	
	<211> 38	
25	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> sintético	
30	<220>	
	<221> L-ARN	
	<222> (1)..(38)	
	<223>	
35	<220>	
	<221> característica miscelánea	
	<222> (1)..(38)	
	<223> L-ARN	
40	<400> 16	
	gcugugaaag caacauguca augaaaggua gccacagc	38
	<210> 17	
45	<211> 38	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
50	<223> sintético	
	<220>	
	<221> característica miscelánea	
	<222> (1)..(38)	
55	<223> L-ARN	
	<400> 17	
	gcugugaaag uaacauguca augaaaggua gccgcagc	38
60	<210> 18	
	<211> 39	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
65	<220>	
	<223> sintético	

	<220>		
	<221> característica miscelánea		
	<222> (1)..(38)		
5	<223> L-ARN		
	<400> 18		
	agcgugaaag uaacacguaa aaugaaaggu aaccacgcu	39	
10	<210> 19		
	<211> 27		
	<212> ARN		
	<213> Secuencia artificial		
15	<220>		
	<223> sintético		
	<220>		
	<221> característica miscelánea		
20	<222> (1)..(27)		
	<223> L-ARN		
	<220>		
	<221> característica miscelánea		
25	<222> (16)..(16)		
	<223> A o ausente		
	<400> 19		
30	aaagyraah gumaaugaa agguarc	27	
	<210> 20		
	<211> 26		
	<212> ARN		
	<213> Secuencia artificial		
35	<220>		
	<223> sintético		
	<220>		
	<221> característica miscelánea		
40	<222> (1)..(26)		
	<223> L-ARN		
	<400> 20		
45	aaagyraah gumaaugaaa gguarc	26	
	<210> 21		
	<211> 27		
	<212> ARN		
50	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> sintético		
55	<220>		
	<221> característica miscelánea		
	<222> (1)..(27)		
	<223> L-ARN		
60	<400> 21		
	aaagyraah gumaaugaa agguarc	27	
	<210> 22		
	<211> 26		
65	<212> ARN		
	<213> Secuencia artificial		

<220>  
 <223> sintético

5 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (1)..(26)  
 <223> L-ARN

10 <400> 22  
 aaagyaacah gucaaugaaa gguarc 26

<210> 23  
 <211> 6

15 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> sintético

20 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (1)..(6)  
 <223> L-ARN

25 <400> 23  
 rshryr 6

<210> 24  
 <211> 6

30 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> sintético

35 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (1)..(6)  
 <223> L-ARN

40 <400> 24  
 yrydsy 6

45 <210> 25  
 <211> 36  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> sintético

<220>  
 <221> característica miscelánea

55 <222> (1)..(36)  
 <223> L-ARN

<400> 25  
 cugugaaagc aacaugucaa ugaaagguag ccgcag 36

60 <210> 26  
 <211> 34  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

65 <220>

<223> sintético

<220>  
 <221> característica miscelánea  
 5 <222> (1)..(34)  
 <223> L-ARN

<400> 26  
 10 ugugaaagca acaugucaau gaaagguagc cgca 34

<210> 27  
 <211> 32  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> sintético

<220>  
 20 <221> característica miscelánea  
 <222> (1)..(32)  
 <223> L-ARN

<400> 27  
 25 gugaaagcaa caugucaaug aaagguagcc gc 32

<210> 28  
 <211> 30  
 <212> ARN  
 30 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> sintético

35 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (1)..(30)  
 <223> L-ARN

<400> 28  
 40 ugaagcaac augucaauga aagguagccg 30

<210> 29  
 <211> 28  
 45 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> sintético

50 <220>  
 <221> L-ARN  
 <222> (1)..(28)  
 <223>

55 <400> 29  
 gaaagcaaca ugucaaugaa agguagcc 28

<210> 30  
 60 <211> 26  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 65 <223> sintético

<220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (1)..(26)  
 <223> L-ARN  
 5  
 <400> 30  
 aaagcaacau gucaaugaaa gguagc 26  
 <210> 31  
 10 <211> 36  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 15 <223> sintético  
 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (1)..(36)  
 20 <223> L-ARN  
 <400> 31  
 gcgugaaagc aacaugucua ugaaagguag cgcgcg 36  
 25 <210> 32  
 <211> 36  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 30 <220>  
 <223> sintético  
 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 35 <222> (1)..(36)  
 <223> L-ARN  
 <400> 32  
 40 gcgcgaaagc aacaugucua ugaaagguag cgcgcg 36  
 <210> 33  
 <211> 34  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 45 <220>  
 <223> sintético  
 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 50 <222> (1)..(34)  
 <223> L-ARN  
 <400> 33  
 55 gcggaaagca acaugucaau gaaagguagc cgcg 34  
 <210> 34  
 <211> 34  
 <212> ARN  
 60 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> sintético  
 65 <220>  
 <221> característica miscelánea

<222> (1)..(34)  
 <223> L-ARN

5 <400> 34  
 cgugaaagca acaugucaau gaaagguagc cgcg 34

10 <210> 35  
 <211> 34  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (1)..(34)  
 <223> L-ARN

20 <400> 35  
 gcgcaaagca acaugucaau gaaagguagc gugc 34

25 <210> 36  
 <211> 34  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> sintético

35 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (1)..(34)  
 <223> L-ARN

40 <400> 36  
 gugcaaagca acaugucaau gaaagguagc gcgc 34

45 <210> 37  
 <211> 34  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> sintético

55 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (1)..(34)  
 <223> L-ARN

60 <400> 37  
 cgcgaaagca acaugucaau gaaagguagc cgug 34

65 <210> 38  
 <211> 34  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

70 <220>  
 <223> sintético

75 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (1)..(34)  
 <223> L-ARN

<400> 38  
 gggcaaagca acaugucaau gaaagguagc gccc 34

5 <210> 39  
 <211> 34  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> sintético

<220>  
 <221> característica miscelánea  
 15 <222> (1)..(34)  
 <223> L-ARN

<400> 39  
 20 ggccaaagca acaugucaau gaaagguagc ggcc 34

<210> 40  
 <211> 34  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> sintético

<220>  
 30 <221> característica miscelánea  
 <222> (1)..(34)  
 <223> L-ARN

<400> 40  
 35 gcccaaagca acaugucaau gaaagguagc gggc 34

<210> 41  
 <211> 34  
 <212> ARN  
 40 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> sintético

45 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (1)..(34)  
 <223> L-ARN

50 <400> 41  
 ccccaaagca acaugucaau gaaagguagc gggg 34

<210> 42  
 <211> 5  
 55 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> sintético

60 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (1)..(5)  
 <223> L-ARN

65 <220>

<221> característica miscelánea  
 <222> (1)..(1)  
 <223> s o ausente

5 <400> 42  
sbbbs 5

<210> 43  
 <211> 5

10 <212> ARN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> sintético

15 <220>  
<221> característica miscelánea  
<222> (1)..(5)  
<223> L-ARN

20 <220>  
<221> característica miscelánea  
<222> (5)..(5)  
<223> s o ausente

25 <400> 43  
sbbvs 5

<210> 44  
 <211> 6

30 <212> ARN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> sintético

<220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (3)..(3)

40 <223> nucleótido = a, g, c o u

<220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (4)..(4)

45 <223> nucleótido = a, g, c o u

<220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (1)..(6)

50 <223> L-ARN

<220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (1)..(1)

55 <223> R o ausente

<220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (2)..(2)

60 <223> s o ausente

<400> 44  
 rsnbv 6

65 <210> 45  
<211> 6

<212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 5 <223> sintético  
  
 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (1)..(6)  
 10 <223> L-ARN  
  
 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (2)..(2)  
 15 <223> nucleótido = a, g, c o u  
  
 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (4)..(4)  
 20 <223> nucleótido = a, g, c o u  
  
 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (5)..(5)  
 25 <223> R o ausente  
  
 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (6)..(6)  
 30 <223> y o ausente  
  
 <400> 45  
 bnbry 6  
  
 35 <210> 46  
 <211> 47  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 40 <220>  
 <223> sintético  
  
 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 45 <222> (1)..(47)  
 <223> L-ARN  
  
 <400> 46  
 50 agcguggugu gaucuagaug uaguggcuga uccuagucag guacgcu 47  
  
 <210> 47  
 <211> 47  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 55 <220>  
 <223> sintético  
  
 <220>  
 60 <221> característica miscelánea  
 <222> (1)..(47)  
 <223> L-ARN  
  
 <400> 47  
 65 agcguggugu gaucuagaug uauuggcuga uccuagucag guacgcu 47

	<210> 48	
	<211> 47	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> sintético	
	<220>	
10	<221> característica miscelánea	
	<222> (1)..(47)	
	<223> L-ARN	
	<400> 48	
15	agcguggugu gaucuagaug uaauggcuga uccuagucag gugcgcu	47
	<210> 49	
	<211> 45	
	<212> ARN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> sintético	
	<220>	
25	<221> característica miscelánea	
	<222> (1)..(45)	
	<223> L-ARN	
	<400> 49	
30	gcgaggugug aucuagaugu aguggcugau ccuagucagg ugcg	45
	<210> 50	
	<211> 45	
35	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> sintético	
40	<220>	
	<221> característica miscelánea	
	<222> (1)..(45)	
	<223> L-ARN	
45	<400> 50	
	gcguggugug aucuagaugu aguggcugau ccuagucagg ugcg	45
	<210> 51	
50	<211> 45	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
55	<223> sintético	
	<220>	
	<221> característica miscelánea	
	<222> (1)..(45)	
60	<223> L-ARN	
	<400> 51	
	gcauggugug aucuagaugu aguggcugau ccuagucagg ugccc	45
65	<210> 52	
	<211> 45	

<212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 5 <223> sintético  
  
 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (1)..(45)  
 10 <223> L-ARN  
  
 <400> 52  
 gcguggugug aucuagaugu aauggcugau ccuagucagg gacgc 45  
  
 15 <210> 53  
 <211> 45  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 20 <220>  
 <223> sintético  
  
 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 25 <222> (1)..(45)  
 <223> L-ARN  
  
 <400> 53  
 gcguggugug aucuagaugu agaggcugau ccuagucagg uacgc 45  
 30  
 <210> 54  
 <211> 45  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 35  
 <220>  
 <223> sintético  
  
 <220>  
 40 <221> característica miscelánea  
 <222> (1)..(45)  
 <223> L-ARN  
  
 <400> 54  
 45 gcguggugug aucuagaugu aaaggcugau ccuagucagg uacgc 45  
  
 <210> 55  
 <211> 45  
 <212> ARN  
 50 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> sintético  
  
 55 <220>  
 <221> L-ARN  
 <222> (1)..(45)  
 <223>  
  
 60 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (1)..(45)  
 <223> L-ARN  
  
 65 <400> 55  
 gcguggugug aucuagaugu aguggcuguu ccuagucagg uaugc 45

- <210> 56  
 <211> 45  
 <212> ARN  
 5 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> sintético  
  
 10 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (1)..(45)  
 <223> L-ARN  
  
 15 <400> 56  
 gcguggugug aucuagaugu aguggcugau ccuaguuagg uacgc 45  
  
 <210> 57  
 <211> 35  
 20 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> sintético  
  
 25 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (1)..(35)  
 <223> L-ARN  
  
 30 <400> 57  
 gugugaucua gauguadwgg cugwuccuag uyagg 35  
  
 <210> 58  
 <211> 35  
 35 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 40 <223> sintético  
  
 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (1)..(35)  
 45 <223> L-ARN  
  
 <400> 58  
 gugugaucua gauguadugg cugauccuag ucagg 35  
  
 50 <210> 59  
 <211> 6  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 55 <220>  
 <223> sintético  
  
 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 60 <222> (1)..(6)  
 <223> L-ARN  
  
 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 65 <222> (1)..(1)  
 <223> A o ausente

- <400> 59  
agcrwg 6
- 5 <210> 60  
<211> 6  
<212> ARN  
<213> Secuencia artificial
- 10 <220>  
<223> sintético
- <220>  
<221> característica miscelánea
- 15 <222> (1)..(6)  
<223> L-ARN
- <220>  
<221> característica miscelánea
- 20 <222> (6)..(6)  
<223> U o ausente
- <400> 60  
kryscu 6
- 25 <210> 61  
<211> 45  
<212> ARN  
<213> Secuencia artificial
- 30 <220>  
<223> sintético
- <220>  
<221> característica miscelánea
- 35 <222> (1)..(45)  
<223> L-ARN
- <400> 61  
gcguggugug aucuagaugu aguggcugau ccuagucagg uacgc 45
- <210> 62  
<211> 43  
<212> ARN
- 45 <213> Secuencia artificial
- <220>  
<223> sintético
- <220>  
<221> característica miscelánea
- 50 <222> (1)..(43)  
<223> L-ARN
- <400> 62  
cgugguguga ucuagaugua guggcugauc cuagucaggu acg 43
- <210> 63  
<211> 41  
<212> ARN
- 60 <213> Secuencia artificial
- <220>  
<223> sintético
- 65 <220>

	<221> característica miscelánea	
	<222> (1)..(41)	
	<223> L-ARN	
5	<400> 63	
	guggugugau cuagauguag uggcugaucc uagucaggua c	41
	<210> 64	
	<211> 39	
10	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> sintético	
15	<220>	
	<221> L-ARN	
	<222> (1)..(39)	
	<223>	
20	<220>	
	<221> característica miscelánea	
	<222> (1)..(39)	
	<223> L-ARN	
25	<400> 64	
	uggugugauc uagauguagu ggcugauccu agucaggua	39
	<210> 65	
30	<211> 37	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
35	<223> sintético	
	<220>	
	<221> característica miscelánea	
	<222> (1)..(37)	
40	<223> L-ARN	
	<400> 65	
	ggugugaucu agauguagug gcugauccua gucaggu	37
45	<210> 66	
	<211> 35	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> sintético	
	<220>	
	<221> característica miscelánea	
55	<222> (1)..(35)	
	<223> L-ARN	
	<400> 66	
	gugugaucua gauguagugg cugauccuag ucagg	35
60	<210> 67	
	<211> 45	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
65	<220>	

<223> sintético

<220>  
 <221> característica miscelánea  
 5 <222> (1)..(45)  
 <223> L-ARN

<400> 67  
 10 gcguggugug aucuagaugu auuggcugau ccuagucagg uacgc 45

<210> 68  
 <211> 45  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> sintético

<220>  
 20 <221> característica miscelánea  
 <222> (1)..(45)  
 <223> L-ARN

<400> 68  
 25 gcgcgugug aucuagaugu auuggcugau ccuagucagg cgcgc 45

<210> 69  
 <211> 43  
 <212> ARN  
 30 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> sintético

35 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (1)..(43)  
 <223> L-ARN

<400> 69  
 40 gcgcguguga ucuagaugua uuggcugauc cuagucaggg cgc 43

<210> 70  
 <211> 43  
 45 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> sintético

50 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (1)..(43)  
 <223> L-ARN

55 <400> 70  
 gggcguguga ucuagaugua uuggcugauc cuagucaggg ccc 43

<210> 71  
 60 <211> 43  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 65 <223> sintético

<220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (1)..(43)  
 <223> L-ARN  
 5  
 <400> 71  
 ggccguguga ucuagaugua uggcugauc cuagucaggg gcc 43  
 <210> 72  
 10 <211> 43  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 15 <223> sintético  
 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (1)..(43)  
 20 <223> L-ARN  
 <400> 72  
 gcccguguga ucuagaugua uggcugauc cuagucaggg ggc 43  
 25 <210> 73  
 <211> 5  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 30 <220>  
 <223> sintético  
 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 35 <222> (1)..(5)  
 <223> L-ARN  
 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 40 <222> (1)..(1)  
 <223> G o ausente  
 <400> 73  
 gssbs 5  
 45 <210> 74  
 <211> 5  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 50 <220>  
 <223> sintético  
 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 55 <222> (1)..(5)  
 <223> L-ARN  
 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 60 <222> (5)..(5)  
 <223> C o ausente  
 <400> 74  
 65 bvssc 5

- <210> 75  
 <211> 6  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> sintético  
  
 <220>  
 10 <221> característica miscelánea  
 <222> (1)..(6)  
 <223> L-ARN  
  
 <220>  
 15 <221> característica miscelánea  
 <222> (1)..(1)  
 <223> A o ausente  
  
 <400> 75  
 20 agcgug 6  
  
 <210> 76  
 <211> 6  
 <212> ARN  
 25 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> sintético  
  
 <220>  
 30 <221> característica miscelánea  
 <222> (1)..(6)  
 <223> L-ARN  
  
 <220>  
 35 <221> característica miscelánea  
 <222> (6)..(6)  
 <223> U o ausente  
  
 <400> 76  
 40 uacgcu 6  
  
 <210> 77  
 <211> 6  
 <212> ARN  
 45 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> sintético  
 50  
  
 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (1)..(6)  
 <223> L-ARN  
 55  
  
 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (1)..(1)  
 <223> A o ausente  
 60  
  
 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (2)..(2)  
 <223> G o ausente  
 65  
  
 <220>

<221> característica miscelánea  
 <222> (5)..(5)  
 <223> nucleótido = a, g, c o u

5 <400> 77  
 agsvns 6

<210> 78  
 <211> 6  
 10 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> sintético  
 15

<220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (1)..(6)  
 <223> L-ARN  
 20

<220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (5)..(5)  
 <223> C o ausente  
 25

<220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (6)..(6)  
 <223> U o ausente  
 30

<400> 78  
 bvbscu 6

<210> 79  
 <211> 39  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 35

<220>  
 <223> sintético  
 40

<220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (1)..(39)  
 <223> L-ARN  
 45

<400> 79  
 gugcugcggg gguuagggcu agaagucggc cugcagcac 39

<210> 80  
 <211> 39  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 50

<220>  
 <223> sintético  
 55

<220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (1)..(39)  
 <223> L-ARN  
 60

<400> 80  
 agcguggcga gguuagggcu agaagucggu cgacacgcu 39  
 65

<210> 81

<211> 39  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> sintético

<220>  
 <221> característica miscelánea  
 10 <222> (1)..(39)  
 <223> L-ARN

<400> 81  
 15 guguugcgga gguuagggu agaagucggu cagcagcac 39

<210> 82  
 <211> 48  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> sintético

<220>  
 25 <221> L-ARN  
 <222> (1)..(48)  
 <223>

<400> 82  
 30 cgugcgcuug agauaggggu uaggguuaa agucggcuga uucucacg 48

<210> 83  
 <211> 39  
 <212> ARN  
 35 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> sintético

40 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (1)..(39)  
 <223> L-ARN

<400> 83  
 45 agcgugaagg gguuagggu cgaagucggc ugacacgcu 39

<210> 84  
 <211> 39  
 50 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> sintético

55 <220>  
 <221> L-ARN  
 <222> (1)..(39)  
 <223>

60 <400> 84  
 gugcugcggg gguuagggu cgaagucggc cgcagcac 39

<210> 85  
 65 <211> 39  
 <212> ARN

<213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> sintético  
 5  
 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (1)..(39)  
 <223> L-ARN  
 10  
 <400> 85  
 guguuucccg gguuagggu ugaagucggc cgcagcac 39  
 <210> 86  
 <211> 39  
 <212>ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 15  
 <220>  
 <223> sintético  
 20  
 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (1)..(39)  
 <223> L-ARN  
 25  
 <400> 86  
 guguugcagg gguuagggu ugaagucggc cgcagcac 39  
 <210> 87  
 <211> 39  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 30  
 <220>  
 <223> sintético  
 35  
 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (1)..(39)  
 <223> L-ARN  
 40  
 <400> 87  
 gugcugcggg gguuagggu caaagucggc cgcagcac 39  
 <210> 88  
 <211> 38  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 45  
 <220>  
 <223> sintético  
 50  
 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (1)..(38)  
 <223> L-ARN  
 55  
 <400> 88  
 gugcugccgg gguuagggu aaagucggcc gacagcac 38  
 <210> 89  
 <211> 39  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 60  
 <210> 89  
 <211> 39  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 65

- <220>  
<223> sintético
- 5 <220>  
<221> característica miscelánea  
<222> (1)..(39)  
<223> L-ARN
- 10 <400> 89  
gugcuguggg ggucagggcu agaagucggc cugcagcac 39
- <210> 90  
<211> 19  
<212> ARN  
15 <213> Secuencia artificial
- <220>  
<223> sintético
- 20 <220>  
<221> característica miscelánea  
<222> (1)..(19)  
<223> L-ARN
- 25 <220>  
<221> característica miscelánea  
<222> (13)..(13)  
<223> A o ausente
- 30 <220>  
<221> característica miscelánea  
<222> (13)..(13)  
<223> A o ausente
- 35 <400> 90  
gguyagggcu hraagucgg 19
- <210> 91  
<211> 19  
40 <212> ARN  
<213> Secuencia artificial
- <220>  
<223> sintético
- 45 <220>  
<221> característica miscelánea  
<222> (1)..(19)  
<223> L-ARN
- 50 <400> 91  
gguyagggcu hraagucgg 19
- <210> 92  
55 <211> 18  
<212> ARN  
<213> Secuencia artificial
- <220>  
60 <223> sintético
- <220>  
<221> característica miscelánea  
<222> (1)..(18)  
65 <223> L-ARN

	<400> 92 gguyagggcu hragucgg	18
5	<210> 93 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> sintético	
15	<220> <221> característica miscelánea <222> (1)..(19) <223> L-ARN	
	<400> 93 gguuagggcu hgaagucgg	19
20	<210> 94 <211> 38 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> sintético	
30	<220> <221> característica miscelánea <222> (1)..(38) <223> L-ARN	
35	<400> 94 ugagauaggg guuagggcuu aaagucggcu gauucuca	38
40	<210> 95 <211> 36 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <221> característica miscelánea <222> (1)..(36) <223> L-ARN	
50	<400> 95 gagauagggg uuagggcuua aagucggcug auucuc	36
55	<210> 96 <211> 29 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> sintético	
65	<220> <221> característica miscelánea <222> (1)..(29) <223> L-ARN	
	<400> 96 gggguuaggg cuuaagucg gcugauucu	29

<210> 97  
 <211> 37  
 <212> ARN  
 5 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> sintético  
  
 10 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (1)..(37)  
 <223> L-ARN  
  
 15 <400> 97  
 gcguggcgag guuagggcua gaagucgguc gacacgc 37  
  
 <210> 98  
 <211> 35  
 20 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> sintético  
  
 25 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (1)..(35)  
 <223> L-ARN  
  
 30 <400> 98  
 cguggcgagg uuagggcuag aagucggucg acacg 35  
  
 <210> 99  
 <211> 33  
 35 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 40 <223> sintético  
  
 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (1)..(33)  
 45 <223> L-ARN  
  
 <400> 99  
 cgggcgaggu uagggcuaga agucggucga ccg 33  
  
 50 <210> 100  
 <211> 32  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 55 <220>  
 <223> sintético  
  
 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 60 <222> (1)..(32)  
 <223> L-ARN  
  
 <400> 100  
 gggcgagguu agggcuagaa gucggucgcc cg 32  
  
 65 <210> 101

<211> 31  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> sintético

<220>  
 <221> característica miscelánea  
 10 <222>(1)..(31)  
 <223> L-ARN

<400> 101  
 15 cggcgagguu agggcuagaa gucgugccc g 31

<210> 102  
 <211> 29  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> sintético

<220>  
 25 <221> característica miscelánea  
 <222> (1)..(29)  
 <223> L-ARN

<400> 102  
 30 cgggagguua gggcuagaag ucggucccg 29

<210> 103  
 <211> 27  
 <212> ARN  
 35 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> sintético

40 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (1)..(27)  
 <223> L-ARN

<400> 103  
 45 gggagguuag ggcuaagaagu cgguccc 27

<210> 104  
 <211> 27  
 50 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> sintético

55 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (1)..(27)  
 <223> L-ARN

60 <400> 104  
 ccgcgguuag ggcuaagaagu cgggcgg 27

<210> 105  
 65 <211> 27  
 <212> ARN

<213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> sintético  
 5  
 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (1)..(27)  
 <223> L-ARN  
 10  
 <400> 105  
 cccggguuag ggcuaagaagu cggcggg 27  
 <210> 106  
 <211> 27  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 15  
 <220>  
 <223> sintético  
 20  
 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (1)..(27)  
 <223> L-ARN  
 25  
 <400> 106  
 ggcggguuag ggcuaagaagu cggcgcc 27  
 <210> 107  
 <211> 29  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 30  
 <220>  
 <223> sintético  
 35  
 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (1)..(29)  
 <223> L-ARN  
 40  
 <400> 107  
 cccgcgguuu gggcuagaag ucgggcggg 29  
 <210> 108  
 <211> 29  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 45  
 <220>  
 <223> sintético  
 50  
 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (1)..(29)  
 <223> L-ARN  
 55  
 <400> 108  
 gccgcgguuu gggcuagaag ucgggcggc 29  
 <210> 109  
 <211> 29  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 60  
 <210> 109  
 <211> 29  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 65

- <220>  
<223> sintético
- 5 <220>  
<221> característica miscelánea  
<222> (1)..(29)  
<223> L-ARN
- 10 <400> 109  
ccccggguua gggcuagaag ucggcgggg 29
- <210> 110  
<211> 29  
<212> ARN  
15 <213> Secuencia artificial
- <220>  
<223> sintético
- 20 <220>  
<221> característica miscelánea  
<222> (1)..(29)  
<223> L-ARN
- 25 <400> 110  
cggcggguua gggcuagaag ucggcgccc 29
- <210> 111  
<211> 29  
30 <212> ARN  
<213> Secuencia artificial
- <220>  
<223> sintético
- 35 <220>  
<221> característica miscelánea  
<222> (1)..(29)  
<223> L-ARN
- 40 <400> 111  
ggcggguua gggcuagaag ucggcgccc 29
- <210> 112  
45 <211> 37  
<212> ARN  
<213> Secuencia artificial
- <220>  
50 <223> sintético
- <220>  
<221> característica miscelánea  
<222> (1)..(37)  
55 <223> L-ARN
- <400> 112  
ugcugcgggg guuagggcua gaagucggcc ugcagca 37
- 60 <210> 113  
<211> 35  
<212> ARN  
<213> Secuencia artificial
- 65 <220>  
<223> sintético

<220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (1)..(35)  
 5 <223> L-ARN  
  
 <400> 113  
 gcugcggggg uuagggcuag aagucggccu gcagc 35  
  
 10 <210> 114  
 <211> 33  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 15 <220>  
 <223> sintético  
  
 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 20 <222> (1)..(33)  
 <223> L-ARN  
  
 <400> 114  
 25 cugcgggggu uagggcuaga agucggccug cag 33  
  
 <210> 115  
 <211> 31  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 30  
 <220>  
 <223> sintético  
  
 <220>  
 35 <221> característica miscelánea  
 <222> (1)..(31)  
 <223> L-ARN  
  
 <400> 115  
 40 ugcggggguu agggcuagaa gucggccugc a 31  
  
 <210> 116  
 <211> 29  
 <212> ARN  
 45 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> sintético  
  
 50 <220>  
 <221> L-ARN  
 <222> (1)..(29)  
 <223>  
  
 55 <400> 116  
 gcggggguua gggcuagaag ucggccugc 29  
  
 <210> 117  
 <211> 29  
 60 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> sintético  
 65  
 <220>

<221> característica miscelánea  
 <222> (1)..(29)  
 <223> L-ARN

5 <400> 117  
 gccgggguua gggcuagaag ucggccggc 29

<210> 118  
 <211> 31  
 10 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> sintético

15 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (1)..(31)  
 <223> L-ARN

20 <400> 118  
 ggccgggguu agggcuagaa gucgccggc c 31

<210> 119  
 25 <211> 31  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 30 <223> sintético

<220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (1)..(31)  
 35 <223> L-ARN

<400> 119  
 cgccgggguu agggcuagaa gucgccggc g 31

40 <210> 120  
 <211> 10  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> sintético

<220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (1)..(10)  
 50 <223> L-ARN

<220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (7)..(7)  
 55 <223> nucleótido = a, g, c o u

<400> 120  
 rksbusnvgr 10

60 <210> 121  
 <211> 10  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

65 <220>

- <223> sintético
- <220>  
 <221> característica miscelánea  
 5 <222> (1)..(10)  
 <223> L-ARN
- <220>  
 <221> característica miscelánea  
 10 <222> (3)..(3)  
 <223> n es cualquier nucleótido
- <220>  
 <221> característica miscelánea  
 15 <222> (3)..(3)  
 <223> nucleótido = a, g, c o u
- <400> 121  
 yynrcassmy 10
- 20 <210> 122  
 <211> 10  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial
- 25 <220>  
 <223> sintético
- <220>  
 <221> característica miscelánea  
 30 <222> (1)..(10)  
 <223> L-ARN
- <400> 122  
 35 rksbugsvgr 10
- <210> 123  
 <211> 10  
 <212> ARN  
 40 <213> Secuencia artificial
- <220>  
 <223> sintético
- 45 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (1)..(10)  
 <223> L-ARN
- 50 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (3)..(3)  
 <223> n es cualquier nucleótido
- 55 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (3)..(3)  
 <223> nucleótido = a, g, c o u
- <400> 123  
 60 yncrcassmy 10
- <210> 124  
 <211> 5  
 65 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

- <220>  
<223> sintético
- 5 <220>  
<221> característica miscelánea  
<222> (1)..(5)  
<223> L-ARN
- 10 <220>  
<221> S o ausente  
<222> (1)..(1)  
<223>
- 15 <220>  
<221> característica miscelánea  
<222> (1)..(1)  
<223> S o ausente
- 20 <400> 124  
sssv 5
- <210> 125  
<211> 5
- 25 <212> ARN  
<213> Secuencia artificial
- <220>  
<223> sintético
- 30 <220>  
<221> característica miscelánea  
<222> (1)..(5)  
<223> L-ARN
- 35 <220>  
<221> característica miscelánea  
<222> (5)..(5)  
<223> S o ausente
- 40 <400> 125  
bsssv 5
- <210> 126  
<211> 5
- 45 <212> ARN  
<213> Secuencia artificial
- <220>  
<223> sintético
- <220>  
<221> característica miscelánea  
<222> (1)..(5)
- 55 <223> L-ARN
- <400> 126  
sgsv 5
- 60 <210> 127  
<211> 5  
<212> ARN  
<213> Secuencia artificial
- 65 <220>  
<223> sintético

<220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (1)..(5)  
 5 <223> L-ARN  
  
 <400> 127  
 yscs 5  
  
 10 <210> 128  
 <211> 5  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 15 <220>  
 <223> sintético  
  
 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 20 <222> (1)..(5)  
 <223> L-ARN  
  
 <400> 128  
 gcsgg 5  
 25  
 <210> 129  
 <211> 5  
 <212> ARN  
 <213> Artificial  
 30  
 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (1)..(5)  
 <223> L-ARN  
 35  
 <400> 129  
 cckgc 5  
  
 <210> 130  
 40 <211> 5  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 45 <223> sintético  
  
 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (1)..(5)  
 50 <223> L-ARN  
  
 <400> 130  
 ssssr 5  
  
 55 <210> 131  
 <211> 5  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 60 <220>  
 <223> sintético  
  
 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 65 <222> (1)..(5)  
 <223> L-ARN

<400> 131  
 ysbss 5

5 <210> 132  
 <211> 45  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> sintético

<220>  
 <221> característica miscelánea

15 <222> (1)..(45)  
 <223> L-ARN

<220>  
 <221> característica miscelánea

20 <222> (1)..(1)  
 <223> 40 kDa-PEG

<400> 132  
 gcguggugug aucuagaugu auuggcugau ccuagucagg uacgc 45

25 <210> 133  
 <211> 36  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> sintético

<220>  
 <221> característica miscelánea

35 <222> (1)..(36)  
 <223> L-ARN

<220>  
 <221> característica miscelánea

40 <222> (1)..(1)  
 <223> 40 kDa-PEG

<400> 133  
 gcgugaaagc aacaugucua ugaaagguag ccgcgc 36

45 <210> 134  
 <211> 29  
 <212> ARN

50 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> sintético

55 <220>  
 <221> característica miscelánea

<222> (1)..(29)  
 <223> L-ARN

60 <220>  
 <221> característica miscelánea

<222> (1)..(1)  
 <223> 40 kDa-PEG

65 <400> 134  
 cgggagguua gggcuagaag ucggucccg 29

<210> 135  
 <211> 29  
 <212> ARN  
 5 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (1)..(29)  
 10 <223> L-ARN  
  
 <220>  
 <221> 40 kDa-PEG  
 <222> (1)..(1)  
 15 <223>  
  
 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (1)..(1)  
 20 <223> 40 kDa-PEG  
  
 <400> 135  
 gccggggguua gggcuagaag ucggccggc 29  
  
 25 <210> 136  
 <211> 31  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 30 <220>  
 <223> sintético  
  
 <220>  
 <221> L-ARN  
 35 <222> (1)..(31)  
 <223>  
  
 <220>  
 <221> 40 kDa-PEG  
 40 <222> (1)..(1)  
 <223>  
  
 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 45 <222> (1)..(1)  
 <223> 40 kDa-PEG  
  
 <400> 136  
 cgccggggguu agggcuagaa gucgccggc g 31  
 50  
 <210> 137  
 <211> 38  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 55  
 <220>  
 <223> sintético  
  
 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 60 <222> (1)..(38)  
 <223> L-ARN  
  
 <220>  
 <221> 40 kDa-PEG- <222> (1)..(1)  
 65 <223>

<220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (1)..(1)  
 5 <223> 40 kDa-PEG-  
  
 <400> 137  
 gcugugaaag caacauguca augaaaggua gccgcagc 38  
  
 10 <210> 138  
 <211> 40  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 15 <220>  
 <223> sintético  
  
 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 20 <222> (1)..(40)  
 <223> L-ARN  
  
 <400> 138  
 uaaggaaacu cggucugaug cgguagcgcu gucgagagcu 40  
 25  
 <210> 139  
 <211> 38  
 <212> ARN  
 <213> Artificial  
 30  
 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (1)..(38)  
 <223> L-ARN  
 35  
 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (1)..(1)  
 <223> 30 kDa-PEG  
 40  
 <400> 139  
 gcugugaaag caacauguca augaaaggua gccgcagc 38  
  
 <210> 140  
 45 <211> 38  
 <212> ARN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (1)..(38)  
 <223> L-ARN  
 50  
  
 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (1)..(1)  
 <223> 100 kDa-HES  
 55  
  
 <400> 140  
 60 gcugugaaag caacauguca augaaaggua gccgcagc 38  
  
 <210> 141  
 <211> 38  
 <212> ARN  
 65 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> sintético

5 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (1)..(38)  
 <223> L-ARN

10 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (1)..(1)  
 <223> 130 kDa-HES

15 <400> 141  
 gcugugaaag caacauguca augaaaggua gccgcagc 38

20 <210> 142  
 <211> 48  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> sintético

25 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (1)..(48)  
 <223> L-ARN

30 <400> 142  
 cgugguccgu ugugucaggu cuauucgccc cggugcaggg cauccgcg 48

35 <210> 143  
 <211> 49  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> sintético

40 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (1)..(49)  
 <223> L-ARN

45 <400> 143  
 gcagugugac gccgacguga uaggacagag cugaucgccg ucaggugag 49

50 <210> 144  
 <211> 49  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

55 <220>  
 <223> sintético

60 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (1)..(49)  
 <223> L-ARN

60 <400> 144  
 caacagcagu gugacgcgga cgugauagga cagagcugau cccgcucag 49

65 <210> 145  
 <211> 38

<212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> sintético

<400> 145  
 gcugugaaaag caacauguca augaaaggua gccgcagc 38

10 <210> 146  
 <211> 38  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> sintético

<400> 146  
 gcugugaaaag uaacauguca augaaaggua accacagc 38

20 <210> 147  
 <211> 38  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> sintético

<400> 147  
 30 gcugugaaaag uaacacguca augaaaggua accgcagc 38

<210> 148  
 <211> 38  
 <212> ARN  
 35 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> sintético

<400> 148  
 40 gcugugaaaag uaacacguca augaaaggua accacagc 38

<210> 149  
 <211> 38  
 <212> ARN  
 45 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> sintético

<400> 149  
 50 gcuguaaaaag uaacauguca augaaaggua acuacagc 38

<210> 150  
 <211> 38  
 <212> ARN  
 55 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> sintético

<400> 150  
 60 gcuguaaaaag uaacauguca augaaaggua acuacagc 38

<210> 151  
 <211> 38

<212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> sintético

<400> 151  
 gcugugaaaag uaacaaguca augaaaggua accacagc 38

10 <210> 152  
 <211> 38  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> sintético

<400> 152  
 gcagugaaaag uaacauguca augaaaggua accacagc 38

20 <210> 153  
 <211> 38  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> sintético

<400> 153  
 30 gcugugaaaag uaacauguca augaaaggua accacugc 38

<210> 154  
 <211> 38  
 <212> ARN  
 35 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> sintético

<400> 154  
 40 gcuaugaaaag uaacauguca augaaaggua accauagc 38

<210> 155  
 <211> 38  
 <212> ARN  
 45 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> sintético

50 <400> 155  
 gcugcgaaaag cgacauguca augaaaggua gccgcagc 38

<210> 156  
 <211> 38  
 <212> ARN  
 55 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> sintético

60 <400> 156  
 gcugugaaaag caacauguca augaaaggua gccacagc 38

65 <210> 157  
 <211> 38

<212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 5 <223> sintético  
  
 <220>  
 <221> sintético  
 <222> (1)..(38)  
 10 <223>  
  
 <400> 157  
 gcugugaaag uaacauguca augaaaggua gccgcagc 38  
  
 15 <210> 158  
 <211> 39  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 20 <220>  
 <223> sintético  
  
 <400> 158  
 25 agcgugaaag uaacacguaa aaugaaaggu aaccacgcu 39  
  
 <210> 159  
 <211> 36  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 30  
 <220>  
 <223> sintético  
  
 <400> 159  
 35 cugugaaagc aacaugucaa ugaaagguag ccgcag 36  
  
 <210> 160  
 <211> 34  
 <212> ARN  
 40 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> sintético  
  
 45 <400> 160  
 ugugaaagca acaugucaau gaaagguagc cgca 34  
  
 <210> 161  
 <211> 32  
 50 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> sintético  
 55  
 <400> 161  
 gugaaagcaa caugucaaug aaagguagcc gc 32  
  
 <210> 162  
 60 <211> 30  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 65 <223> sintético

<400> 162  
 ugaagcaac augucaauga aagguagccg      30

5      <210> 163  
       <211> 28  
       <212> ARN  
       <213> Secuencia artificial

10     <220>  
       <223> sintético

      <400> 163  
       gaaagcaaca ugucaaugaa agguagcc      28

15     <210> 164  
       <211> 26  
       <212> ARN  
       <213> Secuencia artificial

20     <220>  
       <223> sintético

      <400> 164  
       aaagcaacau gucaaugaaa gguagc      26

25     <210> 165  
       <211> 36  
       <212> ARN  
       <213> Secuencia artificial

30     <220>  
       <223> sintético

      <400> 165  
       gcgugaaagc aacaugucaa ugaaagguag ccgcgc      36

35     <210> 166  
       <211> 36  
       <212> ARN  
       <213> Secuencia artificial

40     <220>  
       <223> sintético

      <400> 166  
       gcgcgaaagc aacaugucaa ugaaagguag ccgcgc      36

45     <210> 167  
       <211> 34  
       <212> ARN  
       <213> Secuencia artificial

50     <220>  
       <223> sintético

      <400> 167  
       gcggaagca acaugucaau gaaagguagc ccgc      34

55     <210> 168  
       <211> 34  
       <212> ARN  
       <213> Secuencia artificial

60     <220>  
       <223> sintético

65     <220>  
       <223> sintético

	<400> 168 cgugaaagca acaugucaau gaaagguagc cgcg	34
5	<210> 169 <211> 34 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> sintético	
	<400> 169 gcgcaaagca acaugucaau gaaagguagc gugc	34
15	<210> 170 <211> 34 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> sintético	
25	<400> 170 gugcaaagca acaugucaau gaaagguagc gcgc	34
30	<210> 171 <211> 34 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> sintético	
35	<400> 171 cgcgaaagca acaugucaau gaaagguagc cgug	34
40	<210> 172 <211> 34 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> sintético	
45	<400> 172 gggcaaagca acaugucaau gaaagguagc gccc	34
50	<210> 173 <211> 34 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> sintético	
55	<400> 173 ggccaaagca acaugucaau gaaagguagc ggcc	34
60	<210> 174 <211> 34 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
65	<220> <223> sintético	

<400> 174  
 gcccaaagca acaugucaau gaaagguagc gggc 34

5 <210> 175  
 <211> 34  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> sintético

<400> 175  
 ccccaaagca acaugucaau gaaagguagc gggg 34

15 <210> 176  
 <211> 47  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> sintético

<400> 176  
 agcguggugu gaucuagaug uaguggcuga uccuagucag guacgcu 47

25 <210> 177  
 <211> 47  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> sintético

<400> 177  
 agcguggugu gaucuagaug uauuggcuga uccuagucag guacgcu 47

35 <210> 178  
 <211> 47  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> sintético

<400> 178  
 agcguggugu gaucuagaug uauuggcuga uccuagucag gugcgcu 47

45 <210> 179  
 <211> 45  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> sintético

<400> 179  
 gcgaggugug aucuagaugu aguggcugau ccuagucagg ugcgc 45

55 <210> 180  
 <211> 45  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

60 <220>  
 <223> sintético

65 <220>  
 <223> sintético

	<400> 180 gcguggugug aucuagaugu aguggcugau ccuagucagg ugcgc	45
5	<210> 181 <211> 45 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> sintético	
	<400> 181 gcauggugug aucuagaugu aguggcugau ccuagucagg ugccc	45
15	<210> 182 <211> 45 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> sintético	
25	<400> 182 gcguggugug aucuagaugu aauggcugau ccuagucagg gacgc	45
30	<210> 183 <211> 45 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> sintético	
35	<400> 183 gcguggugug aucuagaugu agaggcugau ccuagucagg uacgc	45
40	<210> 184 <211> 45 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> sintético	
45	<400> 184 gcguggugug aucuagaugu aaaggcugau ccuagucagg uacgc	45
50	<210> 185 <211> 45 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> sintético	
55	<400> 185 gcguggugug aucuagaugu aguggcuguu ccuagucagg uaugc	45
60	<210> 186 <211> 45 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
65	<220> <223> sintético	

<400> 186  
 gcguggugug aucuagaugu aguggcugau ccuaguuagg uacgc 45

5 <210> 187  
 <211> 45  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> sintético

<400> 187  
 gcguggugug aucuagaugu aguggcugau ccuagucagg uacgc 45

15 <210> 188  
 <211> 43  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> sintético

<400> 188  
 cgugguguga ucuagaugua guggcugauc cuagucaggu acg 43

25 <210> 189  
 <211> 41  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> sintético

<400> 189  
 guggugugau cuagauguag uggcugaucc uagucaggua c 41

35 <210> 190  
 <211> 39  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> sintético

<400> 190  
 uggugugauc uagauguagu ggcugauccu agucaggua 39

45 <210> 191  
 <211> 37  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> sintético

<400> 191  
 ggugugaucu agauguagug gcugauccua gucaggu 37

55 <210> 192  
 <211> 35  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

60 <220>  
 <223> sintético

65 <220>  
 <223> sintético

	<400> 192 gugugaucua gauguagugg cugauc cuag ucagg	35
5	<210> 193 <211> 45 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> sintético	
	<400> 193 gcguggugug aucuagaugu auuggcugau ccuagucagg uacgc	45
15	<210> 194 <211> 45 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> sintético	
25	<400> 194 gcgcgugug aucuagaugu auuggcugau ccuagucagg cgcg	45
30	<210> 195 <211> 43 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> sintético	
	<400> 195 gcgcguguga ucuagaugua uuggcugauc cuagucaggg cgc	43
40	<210> 196 <211> 43 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> sintético	
	<400> 196 ggcguguga ucuagaugua uuggcugauc cuagucaggg ccc	43
50	<210> 197 <211> 43 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> sintético	
	<400> 197 ggcguguga ucuagaugua uuggcugauc cuagucaggg gcc	43
60	<210> 198 <211> 43 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
65	<220> <223> sintético	

ES 2 768 051 T3

<400> 198  
 gcccguguga ucuagaugua uuggcugauc cuagucaggg ggc 43

5 <210> 199  
 <211> . 39  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> sintético

<400> 199  
 gugcugcggg gguuagggcu agaagucggc cugcagcac 39

15 <210> 200  
 <211> 39  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> sintético

<400> 200  
 agcguggcga gguuagggcu agaagucggc cgacacgcu 39

25 <210> 201  
 <211> 39  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> sintético

<400> 201  
 guguugcggg gguuagggcu agaagucggc cagcagcac 39

35 <210> 202  
 <211> 48  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> sintético

<400> 202  
 cgugcguug agauaggggu uagggcuuaa agucggcuga uucucacg 48

45 <210> 203  
 <211> 39  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> sintético

<400> 203  
 agcgugaagg gguuagggcu cgaagucggc ugacacgcu 39

55 <210> 204  
 <211> 39  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

60 <220>  
 <223> sintético

65 <220>  
 <223> sintético

	<400> 204		
	gugcugcggg gguuagggcu cgaagucggc cgcagcac	39	
5	<210> 205 <211> 39 <212> ARN <213> Secuencia artificial		
10	<220> <223> sintético		
	<400> 205		
	guguucccgg gguuagggcu ugaagucggc cggcagcac	39	
15	<210> 206 <211> 39 <212> ARN <213> Secuencia artificial		
20	<220> <223> sintético		
	<400> 206		
25	guguugcagg gguuagggcu ugaagucggc cugcagcac	39	
	<210> 207 <211> 39 <212> ARN <213> Secuencia artificial		
30	<220> <223> sintético		
	<400> 207		
35	gugcugcggg gguuagggcu caaagucggc cugcagcac	39	
	<210> 208 <211> 38 <212> ARN <213> Secuencia artificial		
40	<220> <223> sintético		
	<400> 208		
45	gugcugccgg gguuagggcu aaagucggcc gacagcac	38	
	<210> 209 <211> 39 <212> ARN <213> Secuencia artificial		
50	<220> <223> sintético		
	<400> 209		
55	gugcuguggg ggucagggcu agaagucggc cugcagcac	39	
	<210> 210 <211> 38 <212> ARN <213> Secuencia artificial		
60	<220> <223> sintético		
	<400> 210		
65	gugcuguggg ggucagggcu agaagucggc cugcagcac	39	
	<210> 210 <211> 38 <212> ARN <213> Secuencia artificial		
65	<220> <223> sintético		

<400> 210  
 ugagauaggg guuagggcuu aaagucggcu gauucua 38

5 <210> 211  
 <211> 36  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> sintético

<400> 211  
 gagauagggg uuagggcuua aagucggcug auucuc 36

15 <210> 212  
 <211> 29  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> sintético

<400> 212  
 gggguuaggg cuuaaagucg gcugauucu 29

25 <210> 213  
 <211> 37  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> sintético

<400> 213  
 gcguggcgag guuagggcua gaagucgguc gacacgc 37

35 <210> 214  
 <211> 35  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> sintético

<400> 214  
 cguggcgagg uuagggcuag aagucggucg acacg 35

45 <210> 215  
 <211> 33  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> sintético

<400> 215  
 cgggagaggu uagggcuaga agucggucga ccg 33

55 <210> 216  
 <211> 33  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

60 <220>  
 <223> sintético

65 <220>  
 <223> sintético

<400> 216  
 cgggcgaggu uagggcuaga agucggucgc ccg 33

5 <210> 217  
 <211> 31  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> sintético

<400> 217  
 cggcgagguu agggcuagaa gucggucgcc g 31

15 <210> 218  
 <211> 29  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> sintético

<400> 218  
 cgggagguua gggcuagaag ucggucccg 29

25 <210> 219  
 <211> 27  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> sintético

<400> 219  
 gggagguuag ggcuaagaagu cgguccc 27

35 <210> 220  
 <211> 27  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> sintético

<400> 220  
 ccgcgguuag ggcuaagaagu cggcgcg 27

45 <210> 221  
 <211> 27  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> sintético

<400> 221  
 cccggguuag ggcuaagaagu cggcggg 27

55 <210> 222  
 <211> 27  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

60 <220>  
 <223> sintético

65 <220>  
 <223> sintético

<400> 222  
 gccgguuag ggcuaagaagu cggcgcc 27

5 <210> 223  
 <211> 29  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> sintético

<400> 223  
 cccgguua ggcuaagaag ucggcggg 29

15 <210> 224  
 <211> 29  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> sintético

<400> 224  
 gccgguua ggcuaagaag ucggcggc 29

25 <210> 225  
 <211> 29  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> sintético

<400> 225  
 cccgguua ggcuaagaag ucggcggg 29

35 <210> 226  
 <211> 29  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> sintético

<400> 226  
 cggcguua ggcuaagaag ucggcgcc 29

45 <210> 227  
 <211> 29  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> sintético

<400> 227  
 gccgguua ggcuaagaag ucggcgcc 29

55 <210> 228  
 <211> 37  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

60 <220>  
 <223> sintético

65 <220>  
 <223> sintético

<400> 228  
 ugcugcgggg guuagggcua gaagucggcc ugcagca 37

5 <210> 229  
 <211> 35  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> sintético

<400> 229  
 gcugcggggg uuagggcuag aagucggccu gcagc 35

15 <210> 230  
 <211> 33  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> sintético

<400> 230  
 cugcgggggu uagggcuaga agucggccug cag 33

25 <210> 231  
 <211> 31  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> sintético

<400> 231  
 ugcggggguu agggcuagaa gucggccugc a 31

35 <210> 232  
 <211> 29  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> sintético

<400> 232  
 gcggggguua gggcuagaag ucggccugc 29

45 <210> 233  
 <211> 29  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> sintético

<400> 233  
 gccggggguua gggcuagaag ucggccggc 29

55 <210> 234  
 <211> 31  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

60 <220>  
 <223> sintético

65 <220>  
 <223> sintético

<400> 234  
 ggccgggguu agggcuagaa gucgccggc c 31

5 <210> 235  
 <211> 31  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> sintético

<400> 235  
 cgccgggguu agggcuagaa gucgccggc g 31

15 <210> 236  
 <211> 48  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> sintético

<400> 236  
 cgugguccgu ugugucaggu cuauucgcc cgugcaggg cauccgcg 48

25 <210> 237  
 <211> 49  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> sintético

<400> 237  
 gcagugugac gcggacguga uaggacagag cugauccgc ucaggugag 49

35 <210> 238  
 <211> 49  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> sintético

<400> 238  
 caacagcagu gugacgcgga cgugauagga cagagcugau cccgcucag 49

45 <210> 239  
 <211> 40  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> sintético

55 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (1)..(40)  
 <223> L-ARN

60 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (1)..(1)  
 <223> pegilado

65 <400> 239

uaaggaacu cggucugaug cgguagcgcu gugcagagcu 40

<210> 240  
 <211> 45  
 5 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> sintético

10 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (1)..(45)  
 <223> L-ARN

15 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (1)..(1)  
 <223> 30-kDa-PEG

20 <400> 240  
 gcguggugug aucuagaugu auuggcugau ccuagucagg uacgc 45

<210> 241  
 25 <211> 45  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 30 <223> sintético

<220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (1)..(45)  
 35 <223> L-ARN

<220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (1)..(1)  
 40 <223> 40-kDa-PEG

<400> 241  
 cgcauggacu gauccuaguc gguuauguag aucuagugug gugcg 45

## REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ácido nucleico L- de unión a SDF-1 para uso en terapia, en donde la terapia comprende influir en la migración de las células, de este modo la migración de las células comprende la movilización de células en la sangre periférica de un sujeto, de este modo las células se seleccionan del grupo que consiste en células madre, células cancerosas, células plasmáticas de vida larga, células B y células T, en las que las moléculas de ácido nucleico se seleccionan del grupo que consiste en moléculas de ácido nucleico de tipo A, moléculas de ácido nucleico de tipo B, moléculas de ácido nucleico de tipo C y moléculas de ácido nucleico que tienen una secuencia de ácido nucleico según cualquiera de SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 143, SEQ ID NO: 144, mediante la cual las moléculas de ácido nucleico de tipo A comprenden la siguiente secuencia de nucleótidos central:
- 5 5' AAAGYRACAHGUMAAX<sub>A</sub>UGAAAGGUARC 3' (SEQ ID NO: 19)
- en la que X<sub>A</sub> está ausente o es A,
- en la que las moléculas de ácido nucleico de tipo B comprenden la siguiente secuencia de nucleótidos central:
- 5' GUGUGAUCUAGAUGUADWGGCUGWUCCUAGUYAGG 3' (SEQ ID NO: 57), y
- en la que las moléculas de ácido nucleico de tipo C comprenden una secuencia de nucleótidos central de
- 15 GGUYAGGGCUHRX<sub>A</sub>AGUCGG (SEQ ID NO: 90),
- en la que X<sub>A</sub> está ausente o es A.
2. Una molécula de ácido nucleico L- de unión a SDF-1 para uso en un método para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en lupus sistémico eritematoso y manifestaciones del mismo, glomerulonefritis y nefropatía, preferiblemente nefropatía diabética;
- 20 en la que la molécula de ácido nucleico se selecciona del grupo que consiste en moléculas de ácido nucleico de tipo A, moléculas de ácido nucleico de tipo B, moléculas de ácido nucleico de tipo C y moléculas que tienen una secuencia de ácidos nucleicos según cualquiera de SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 143, SEQ ID NO: 144,
- en la que las moléculas de ácido nucleico A comprenden la siguiente secuencia de nucleótidos central:
- 5' AAAGYRACAHGUMAAX<sub>A</sub>UGAAAGGUARC 3' (SEQ ID NO: 19)
- 25 en la que X<sub>A</sub> está ausente o es A,
- en la que las moléculas de ácido nucleico de tipo B comprenden la siguiente secuencia de nucleótidos central:
- 5' GUGUGAUCUAGAUGUADWGGCUGWUCCUAGUYAGG 3' (SEQ ID NO: 57), y
- en las que las moléculas de ácido nucleico de tipo C comprende una secuencia de nucleótidos central de
- GGUYAGGGCUHRX<sub>A</sub>AGUCGG (SEQ ID NO: 90),
- 30 en la que X<sub>A</sub> está ausente o es A.
3. El ácido nucleico L- para uso de la reivindicación 2, en donde la molécula de ácido nucleico L- inhibe la migración de leucocitos, células dendríticas y mastocitos.
4. Una molécula de ácido nucleico L- de unión a SDF-1 para uso en un método para obtener células progenitoras y/o células madre de un primer sujeto, en el que el método comprende
- 35 a) administrar al sujeto la molécula de ácido nucleico en una cantidad eficaz para movilizar dichas células progenitoras y/o células madre en la sangre periférica de dicho sujeto;
- b) seguido del cultivo de dichas células progenitoras y/o células madre a partir de dicho sujeto,
- en donde la molécula de ácido nucleico se selecciona del grupo que consiste en moléculas de ácido nucleico de tipo A, moléculas de ácido nucleico de tipo B, moléculas de ácido nucleico de tipo C y moléculas de ácido nucleico que
- 40 tienen una secuencia de ácidos nucleicos según cualquiera de SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 143 y SEQ ID NO: 144,
- en la que las moléculas de ácido nucleico de tipo A comprenden la siguiente secuencia de nucleótidos central:
- 5' AAAGYRACAHGUMAAX<sub>A</sub>UGAAAGGUARC 3' (SEQ ID NO: 19)
- en la que X<sub>A</sub> está ausente o es A,
- 45 en la que las moléculas de ácido nucleico de tipo B comprenden la siguiente secuencia de nucleótidos central:

- 5' GUGUGAUCUAGAUGUADWGGCUGWUCCUAGUYAGG 3' (SEQ ID NO: 57), y  
 en la que las moléculas de ácido nucleico de tipo C comprenden una secuencia de nucleótidos central de GGUYAGGGCUHRX<sub>A</sub>AGUCGG (SEQ ID NO: 90),  
 en la que X<sub>A</sub> está ausente o es A.
- 5 5. Una molécula de ácido nucleico L- de unión a SDF-1 para uso en un método para la reducción de células plasmáticas de vida larga, células B y/o células T de un sujeto cuyo método comprende
- a) administrar al sujeto una molécula de ácido nucleico en una cantidad eficaz para movilizar dichas células plasmáticas de vida larga, células B y/o células T de memoria en la sangre periférica de dicho sujeto;
- b) seguido del cultivo de dichas células plasmáticas de vida larga, células B y/o células T de memoria en la sangre periférica de dicho sujeto;
- 10 en donde la molécula de ácido nucleico se selecciona del grupo que consiste en moléculas de ácido nucleico de tipo A, moléculas de ácido nucleico de tipo B, moléculas de ácido nucleico de tipo C y moléculas de ácido nucleico que tienen una secuencia de ácidos nucleicos según cualquiera de SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 143 y SEQ ID NO: 144,
- 15 en la que las moléculas de ácido nucleico de tipo A comprenden la siguiente secuencia de nucleótidos central:  
 5' AAAGYRACAHGUMAAX<sub>A</sub>UGAAAGGUARC 3' (SEQ ID NO: 19)  
 en la que X<sub>A</sub> está ausente o es A,  
 en la que las moléculas de ácidos nucleicos de tipo B comprenden la siguiente secuencia de nucleótidos central:  
 5' GUGUGAUCUAGAUGUADWGGCUGWUCCUAGUYAGG 3' (SEQ ID NO: 57), y
- 20 en la que las moléculas de ácido nucleico de tipo C comprenden una secuencia de nucleótidos central de GGUYAGGGCUHRX<sub>A</sub>AGUCGG (SEQ ID NO: 90),  
 en la que X<sub>A</sub> está ausente o es A,  
 en el que preferiblemente las células T reducidas y cultivadas son células T de memoria.
- 25 6. Una molécula de ácido nucleico L- de unión a SDF-1 para uso en terapia, en donde la terapia comprende inhibir la migración de leucocitos, en la que la molécula de ácido nucleico se selecciona del grupo que consiste en moléculas de ácido nucleico de tipo A, moléculas de ácido nucleico de tipo B, moléculas de ácido nucleico de tipo C y moléculas que tienen una secuencia de ácidos nucleicos según cualquiera de SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 143, SEQ ID NO: 144,  
 mediante la cual las moléculas de ácido nucleico A comprenden la siguiente secuencia de nucleótidos central:
- 30 5' AAAGYRACAHGUMAAX<sub>A</sub>UGAAAGGUARC 3' (SEQ ID NO: 19)  
 en la que X<sub>A</sub> está ausente o es A,  
 en la que las moléculas de ácidos nucleicos de tipo B comprende la siguiente secuencia de nucleótidos central:  
 5' GUGUGAUCUAGAUGUADWGGCUGWUCCUAGUYAGG 3' (SEQ ID NO: 57), y
- 35 en la que las moléculas de ácido nucleicos de tipo C comprende una secuencia de nucleótidos central de GGUYAGGGCUHRX<sub>A</sub>AGUCGG (SEQ ID NO: 90),  
 en la que X<sub>A</sub> está ausente o es A.
7. La molécula de ácido nucleico para uso según la reivindicación 6, en donde, en la migración de los leucocitos, los leucocitos se acumulan en un tejido en el que la acumulación de los leucocitos conduce preferiblemente a una inflamación en el tejido.
- 40 8. Uso de una molécula de ácido nucleico L- de unión a SDF-1 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en lupus sistémico eritematoso y manifestaciones del mismo, glomerulonefritis y nefropatía, preferiblemente nefropatía diabética;
- 45 en la que la molécula de ácido nucleico se selecciona del grupo que consiste en moléculas de ácido nucleico de tipo A, moléculas de ácido nucleico de tipo B, moléculas de ácido nucleico de tipo C y moléculas que tienen una secuencia de ácidos nucleicos según cualquiera de SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 143, SEQ ID NO: 144,

mediante la cual las moléculas de ácido nucleico A comprenden la siguiente secuencia de nucleótidos central:

5' AAAGYRACAHGUMAAX<sub>A</sub>UGAAAGGUARC 3' (SEQ ID NO: 19)

en la que X<sub>A</sub> está ausente o es A,

en la que las moléculas de ácido nucleico de tipo B comprenden la siguiente secuencia de nucleótidos central:

5 5' GUGUGAUCUAGAUGUADWGGCUGWUCCUAGUYAGG 3' (SEQ ID NO: 57), y

en la que las moléculas de ácido nucleico de tipo C comprenden una secuencia de nucleótidos central de GGUYAGGGCUHRX<sub>A</sub>AGUCGG (SEQ ID NO: 90),

en la que X<sub>A</sub> está ausente o es A.

10 9. Uso según la reivindicación 8, en donde la molécula de ácido nucleico L- inhibe la migración de leucocitos, células dendríticas y mastocitos.

10. Uso de una molécula de ácido nucleico L- de unión a SDF-1 para la fabricación de un medicamento para uso en un método para tratar y/o prevenir una enfermedad, en donde el método comprende inhibir la migración de leucocitos, en la que la molécula de ácido nucleico se selecciona del grupo que consiste en moléculas de ácido nucleico de tipo A, moléculas de ácido nucleico de tipo B, moléculas de ácido nucleico de tipo C y moléculas que tienen una secuencia de ácido nucleico según cualquiera de SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 143, SEQ ID NO: 144,

15

mediante la cual las moléculas de ácido nucleico A comprenden la siguiente secuencia de nucleótidos central:

5' AAAGYRACAHGUMAAX<sub>A</sub>UGAAAGGUARC 3' (SEQ ID NO: 19)

en la que X<sub>A</sub> está ausente o es A,

en la que las moléculas de ácido nucleico de tipo B comprenden la siguiente secuencia de nucleótidos central:

20 5' GUGUGAUCUAGAUGUADWGGCUGWUCCUAGUYAGG 3' (SEQ ID NO: 57), y

en la que las moléculas de ácido nucleicos de tipo C comprenden una secuencia de nucleótidos central de GGUYAGGGCUHRX<sub>A</sub>AGUCGG (SEQ ID NO: 90),

en la que X<sub>A</sub> está ausente o es A.

25 11. Uso de una molécula de ácido nucleico L- de unión a SDF-1 para la fabricación de un medicamento, en el que el medicamento es para el tratamiento de una enfermedad y/o trastorno que implica angiogénesis y/o neovascularización, en el que el medicamento es para uso en terapia de combinación con un agente que inhibe VEGF o en el que el medicamento es para uso en un sujeto que no responde a la terapia con el agente que inhibe VEGF, y

30 en la que la molécula de ácido nucleico se selecciona del grupo que consiste en moléculas de ácido nucleico de tipo A, moléculas de ácido nucleico de tipo B, moléculas de ácido nucleico de tipo C y moléculas que tienen una secuencia de ácido nucleico según cualquiera de

SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 143, SEQ ID NO: 144,

mediante la cual las moléculas de ácido nucleico de tipo A comprenden la siguiente secuencia de nucleótidos central:

35 5' AAAGYRACAHGUMAAX<sub>A</sub>UGAAAGGUARC 3' (SEQ ID NO: 19)

en la que X<sub>A</sub> está ausente o es A,

en la que las moléculas de ácido nucleico de tipo B comprenden la siguiente secuencia de nucleótidos central:

5' GUGUGAUCUAGAUGUADWGGCUGWUCCUAGUYAGG 3' (SEQ ID NO: 57), y

40 en la que las moléculas de ácido nucleico de tipo C comprenden una secuencia de nucleótidos central de GGUYAGGGCUHRX<sub>A</sub>AGUCGG (SEQ ID NO: 90),

en la que X<sub>A</sub> está ausente o es A.

12. Uso de una molécula de ácido nucleico L- de unión a SDF-1 para la fabricación de un medicamento, en la que el medicamento es para la restauración o mejora de un sistema inmune en un sujeto y

en la que la molécula de ácido nucleico se selecciona del grupo que consiste en moléculas de ácido nucleico de tipo A, moléculas de ácido nucleico de tipo B, moléculas de ácido nucleico de tipo C y moléculas que tienen una secuencia de ácido nucleico según cualquiera de SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 143, SEQ ID NO: 144,

mediante la cual las moléculas de ácido nucleico A comprenden la siguiente secuencia de nucleótidos central:

5 5' AAAGYRACAHGUMAAX<sub>A</sub>UGAAAGGUARC 3' (SEQ ID NO: 19)

en la que X<sub>A</sub> está ausente o es A,

en la que las moléculas de ácidos nucleicos de tipo B comprenden la siguiente secuencia de nucleótidos central:

5' GUGUGAUCUAGAUGUADWGGCUGWUCCUAGUYAGG 3' (SEQ ID NO: 57), y

10 en la que las moléculas de ácido nucleico de tipo C comprenden una secuencia de nucleótidos central de GGUYAGGGCUHRX<sub>A</sub>AGUCGG (SEQ ID NO: 90),

en la que X<sub>A</sub> está ausente o es A.

13. Uso de una molécula de ácido nucleico L- de unión a SDF-1 para la fabricación de un medicamento, en el que el medicamento es para la administración a un sujeto antes o de manera simultánea con quimioterapia, preferiblemente quimioterapia administrada para el tratamiento del cáncer,

15 en la que la molécula de ácido nucleico se selecciona del grupo que consiste en moléculas de ácido nucleico de tipo A, moléculas de ácido nucleico de tipo B, moléculas de ácido nucleico de tipo C y moléculas de ácido nucleico que tienen una secuencia de ácido nucleico según cualquiera de SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 143, SEQ ID NO: 144,

mediante la cual las moléculas de ácido nucleico de tipo A comprenden la siguiente secuencia de nucleótidos central:

20 5' AAAGYRACAHGUMAAX<sub>A</sub>UGAAAGGUARC 3' (SEQ ID NO: 19)

en la que X<sub>A</sub> está ausente o es A,

en la que las moléculas de ácidos nucleicos de tipo B comprenden la siguiente secuencia de nucleótidos central:

5' GUGUGAUCUAGAUGUADWGGCUGWUCCUAGUYAGG 3' (SEQ ID NO: 57), y

25 en la que las moléculas de ácidos nucleicos de tipo C comprenden una secuencia de nucleótidos central de GGUYAGGGCUHRX<sub>A</sub>AGUCGG (SEQ ID NO: 90),

en la que X<sub>A</sub> está ausente o es A.

14. La molécula de ácido nucleico para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, y el uso según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13, en donde la molécula de ácido nucleico comprende una modificación, en la que la modificación se selecciona del grupo que consiste en una fracción HES y una fracción PEG.

30 15. La molécula de ácido nucleico para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y 14, y el uso según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 14, en donde la molécula de ácido nucleico es una molécula de ácido nucleico de tipo A, en la que la molécula de ácido nucleico de tipo A tiene una secuencia de ácido nucleico según cualquiera de SEQ. ID. Nos 5 a 18, 25 a 41, 133, 137 y 139 a 141.

35 16. La molécula de ácido nucleico para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y 14, y el uso según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 14, en donde la molécula de ácido nucleico es una molécula de ácido nucleico de tipo B, en la que la molécula de ácido nucleico de tipo B tiene una secuencia de ácido nucleico según cualquiera de SEQ. ID. Nos 46 a 56, 61 a 72 y 132.

40 17. La molécula de ácido nucleico para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y 14, y el uso según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 14, en donde la molécula de ácido nucleico es una molécula de ácido nucleico de tipo C, en la que la molécula de ácido nucleico de tipo C tiene una secuencia de ácido nucleico según cualquiera de SEQ. ID. Nos 79 a 89, 94 a 119 y 134 a 136.

Ácidos nucleicos que se unen a SDF1 de Tipo A

Nombre	nt.	Secuencia : 5' -3'	Comp.
192-A10-001	38	GCUGUGAAAGCAACAUGUCAAA-UGAAAGGUAGC <b>CGCAGC</b>	
192-G10	38	GCUGUGAAAGUAACAUGUCAAA-UGAAAGGUAAAC <b>CACAGC</b>	<
192-F10	38	GCUGUGAAAGUAACACGUCAAA-UGAAAGGUAAAC <b>CGCAGC</b>	<
192-B11	38	GCUGUGAAAGUAACACGUCAAA-UGAAAGGUAAAC <b>CACAGC</b>	=
192-C9	38	GCUGUA <b>AAAGUAACAUGUCAAA-UGAAAGGUAAACUA</b> CAGC	<
192-E10	38	GCUGUA <b>AAAGUAACAAGUCAAA-UGAAAGGUAAACUA</b> CAGC	<
192-C10	38	GCUGUGAAAGUAACAAGUCAAA-UGAAAGGUAAAC <b>CACAGC</b>	=
192-D11	38	GC <b>AGUG</b> AAAGUAACAUGUCAAA-UGAAAGGUAAAC <b>CACAGC</b>	<
192-G11	38	GCUGUGAAAGUAACAUGUCAAA-UGAAAGGUAAAC <b>CACUGC</b>	<
192-H11	38	GC <b>UAUG</b> AAAGUAACAUGUCAAA-UGAAAGGUAAAC <b>CAUAGC</b>	<
192-D10	38	GCUG <b>CG</b> AAAGCGACAUGUCAAA-UGAAAGGUAGC <b>CGCAGC</b>	<<
192-E9	38	GCUGUGAAAGCAACAUGUCAAA-UGAAAGGUAGC <b>CACAGC</b>	<<
192-H9	38	GCUGUGAAAGUAACAUGUCAAA-UGAAAGGUAGC <b>CGCAGC</b>	<<
191-A6	39	<b>AGCGUG</b> AAAGUAACACGU <b>AAAA</b> UGAAAGGUAAAC <b>CACGCU</b>	<
Fórmula-1 Tipo A	26	AAAGYRACAHGUMAA <b>X</b> UGAAAGGUARC	
Fórmula-2 Tipo A	26	AAAGYRACAHGUMAA-UGAAAGGUARC	
Fórmula-3 Tipo A	27	AAAGYRACAHGUMAAAUGAAAGGUARC	
Fórmula-4 Tipo A	26	AAAGYAACA <b>H</b> GUCAAA-UGAAAGGUARC	
Fórmula-5-5' Tipo A		RSHRYR	
Fórmula-5-3' Tipo A		YRYDSY	

**Nucleótidos terminales que pueden hibridar entre sí (negrita)**

nucleótidos que pueden comprender principalmente motivo de unión a SDF-1

nt.:= nucleótidos

posición variable

**Fig. 1**

**Comp.:**=Clones que se ensayaron como aptámeros en un ensayo de unión de competición frente a 192-A10-001;

=:= afinidad de unión igual que 192-A10-001

<:=afinidad de unión más débil que 192-A10-001

<<:=afinidad de unión mucho más débil que 192-A10-001

**Fig. 1 Continuación**

**Derivados del Ácido Nucleico que se unen a SDF de Tipo A 192-A10-001**

Nombre	nt.	Secuencia : 5' -3'	Comp.	PD: K <sub>0</sub> [nM]	Biacore: K <sub>0</sub> [nM]	TAX IC <sub>50</sub> [nM]
192-A10-001	38	GCUGUGAAAGGCAACAUGUCAAUGAAAGGUAGC <b>CGCAGC</b>		1,5	1,0	0,1 - 0,2
192-A10-002	36	CUGUGAAAGCAACAUGUCAAUGAAAGGUAGC <b>CGCAG</b>	=			=
192-A10-003	34	UGUGAAAGCAACAUGUCAAUGAAAGGUAGC <b>CGCA</b>	<			<
192-A10-004	32	GUGAAAGCAACAUGUCAAUGAAAGGUAGC <b>CGC</b>	<<			<<
192-A10-005	30	UGAAAGCAACAUGUCAAUGAAAGGUAGC <b>CG</b>	<<			<<
192-A10-006	28	CAAAGCAACAUGUCAAUGAAAGGUAGC <b>C</b>	<<<			<<
192-A10-007	26	AAAGCAACAUGUCAAUGAAAGGUAGC	i. a.			

**Nucleótidos terminales en el extremo 5' y en el extremo 3' que se pueden hibridar entre sí (negrita) nt.: = nucleótidos**

**Nucleótidos que pueden comprender principalmente un motivo de unión a SDF** i.a.: = inactivo =: = afinidad de unión igual que 192-A10-001  
 <<<<<<: = afinidad de unión más débil (<) muy débil (<<) mucho más débil (<<<) que 192-A1-001

**Comp.:** = Clones que se ensayaron como aptámeros en un ensayo de unión de competición frente a 193-A10-001

**PD.:** = Clones que se ensayaron como aptámeros en un ensayo de unión pull-down.

**TAX:** = Clones que se ensayaron como Spiegelmeros en un ensayo de quimiotaxis in vitro

**Fig. 2A**

**Derivados de Ácido Nucleico 192-A10-001 de Tipo A que se unen a SDF.**

Nombre	nt.	Secuencia : 5'-3'	Comp.	PD: K <sub>b</sub> [nM]	Biacore: K <sub>b</sub> [nM]	TAX IC <sub>50</sub> [nM]
192-A10-001	38	GCUGUC <b>AAAGCAACAUGUCAUUGAAAGGUAGCGCAGC</b>		1,5	1,0	0,1 - 0,2
192-A10-002	36	CUGUC <b>AAAGCAACAUGUCAUUGAAAGGUAGCGCAG</b>	=			=
192-A10-008	36	GCUG <b>AAAGCAACAUGUCAUUGAAAGGUAGCGC</b>	=	1,5	1,4	=
192-A10-015	36	GC <b>CGCAAGCAACAUGUCAUUGAAAGGUAGCGC</b>	<	4,6		
192-A10-014	34	GC <b>CGCAAGCAACAUGUCAUUGAAAGGUAGCGC</b>	<	8,0		=
192-A10-016	34	CGUC <b>AAAGCAACAUGUCAUUGAAAGGUAGCGC</b>	<			
192-A10-017	34	CG <b>CGCAAGCAACAUGUCAUUGAAAGGUAGCGC</b>	l.a.			
192-A10-018	34	GUG <b>CAAGCAACAUGUCAUUGAAAGGUAGCGC</b>	<<<			
192-A10-019	34	CG <b>CGCAAGCAACAUGUCAUUGAAAGGUAGCGC</b>	<<			
192-A10-020	34	GG <b>CGCAAGCAACAUGUCAUUGAAAGGUAGCGC</b>	<<*			
192-A10-021	34	GG <b>CCCAAGCAACAUGUCAUUGAAAGGUAGCGC</b>	<<*			
192-A10-022	34	GG <b>CCCAAGCAACAUGUCAUUGAAAGGUAGCGC</b>	<<*			
192-A10-023	34	CC <b>CGCAAGCAACAUGUCAUUGAAAGGUAGCGC</b>	<<*			

**Nucleótidos terminales en el extremo 5' y en el extremo 3' que pueden hibridar entre sí (negrita) nt.:= nucleótidos**

Nucleótidos que pueden comprender principalmente un motivo de unión a SDF (a.:=inactivo =:= afinidad de unión igual que 192-A10-001 </<<<:=afinidad de unión más débil (<) muy débil (<<) o mucho más débil que 192-A1-001/-008

**Comp.:=** Clones que se ensayaron como aptámeros en un ensayo de unión de competición frente a 192-A10-001 (\*=excepto a partir de 192-A10-20, -021, -022, y -023 que se ensayaron frente a 193-A10-008 que tiene la afinidad de unión idéntica a 192-A10-001)

**PD.:=** Clones que se ensayaron como aptámeros en un ensayo de unión pull-down.

**TAX.:=** Clones que se ensayaron como Spiegelmeros en un cultivo celular en un ensayo de quimiotaxis in vitro

**Fig. 2B**

**Ácidos nucleicos que se unen a SDF-1 de Tipo B**

Nombre	nt.	Secuencia: 5' - 3'	Comp.
193-C2-001	47	<b>AGCGUG</b> GUGUGAUCUAGAUGUAGUGGCUGAUCCUAGUCAGG <b>UACGCU</b>	+
193-G2-001	47	<b>AGCGUG</b> GUGUGAUCUAGAUGUAGUGGCUGAUCCUAGUCAGG <b>UACGCU</b>	+
193-F2-001	47	<b>AGCGUG</b> GUGUGAUCUAGAUGUAGUGGCUGAUCCUAGUCAGG <b>UACGCU</b>	+
193-G1-002	45	<b>GCGAG</b> GUGUGAUCUAGAUGUAGUGGCUGAUCCUAGUCAGG <b>UACGC</b>	<<
193-D2-002	45	<b>GCGUG</b> GUGUGAUCUAGAUGUAGUGGCUGAUCCUAGUCAGG <b>UACGC</b>	<
193-A1-002	45	<b>GCAUG</b> GUGUGAUCUAGAUGUAGUGGCUGAUCCUAGUCAGG <b>UACCC</b>	<<<
193-D3-002	45	<b>GCGUG</b> GUGUGAUCUAGAUGUAGUGGCUGAUCCUAGUCAGG <b>UACGC</b>	<
193-B3-002	45	<b>GCGUG</b> GUGUGAUCUAGAUGUAGUGGCUGAUCCUAGUCAGG <b>UACGC</b>	<<
193-H3-002	45	<b>GCGUG</b> GUGUGAUCUAGAUGUAGUGGCUGAUCCUAGUCAGG <b>UACGC</b>	<
193-E3-002	45	<b>GCGUG</b> GUGUGAUCUAGAUGUAGUGGCUGAUCCUAGUCAGG <b>UAUGC</b>	<<
193-D1-002	45	<b>GCGUG</b> GUGUGAUCUAGAUGUAGUGGCUGAUCCUAGU <b>UAGGUACGC</b>	<<<
Fórmula-1 Tipo B	35	<b>GUGUGAUCUAGAUGUAGUGGCUGAUCCUAGU<b>UAGG</b></b>	
Fórmula-2 Tipo B	35	<b>GUGUGAUCUAGAUGUAGUGGCUGAUCCUAGUCAGG</b>	
Fórmula-3-5' Tipo B		X <sub>1</sub> GCRWG	
Fórmula-3-3' Tipo B		KRYSCX <sub>4</sub>	

**nucleótidos terminales que pueden hibridar entre si (negrita)**

**nucleótidos que pueden comprender principalmente un motivo de unión a SDF**

**nt.:=** nucleótidos      **posición variable**

**Comp.:=** Los clones C2, G2, y F2 se ensayaron como aptámeros en un ensayo de unión de competición frente a 192-A10-001; los demás clones se ensayaron como aptámeros en un ensayo de unión de competición frente a 193-G2-012 que tiene la afinidad de unión idéntica a 193-G2-001 (Veáse la Fig 4B)

+:=mejor afinidad de unión que 192-A10-001

</<</<<<:=afinidad de unión más débil (<) muy débil (<<) mucho más débil (<<<) que 193-G2-001/-012

X<sub>1</sub> ='A' o ausente      X<sub>4</sub> ='U' o ausente

**Fig. 3**

**Derivados de Ácidos Nucleicos que se unen a SDF de Tipo B 193-C2/G2-001**

Nombre	nt.	Secuencia : 5' - 3'	Comp.	PD K <sub>0</sub> [nM]	Biacore K <sub>0</sub> [nM]
193-G2-001	47	AGCGUGGUGUGAUCUAGAUGAUUUGGCCUGAUCCUAGUCAGGUACGCU		0,3	0,5
193-C2-001	47	AGCGUGGUGUGAUCUAGAUGAUUUGGCCUGAUCCUAGUCAGGUACGCU	=		0,6
193-C2-002	45	GCUGUGUGUGAUCUAGAUGAUUUGGCCUGAUCCUAGUCAGGUACGCG	=		0,8
193-C2-003	43	CGUGUGUGUGAUCUAGAUGAUUUGGCCUGAUCCUAGUCAGGUACGG	<		
193-C2-004	41	GUGUGUGAUCUAGAUGAUUUGGCCUGAUCCUAGUCAGGUAC	<<		
193-C2-005	39	UGUGUGAUCUAGAUGAUUUGGCCUGAUCCUAGUCAGGUUA	<<<		
193-C2-006	37	GUGUGAUCUAGAUGAUUUGGCCUGAUCCUAGUCAGGU	<<<		
193-C2-007	35	GUGUGAUCUAGAUGAUUUGGCCUGAUCCUAGUCAGG	i. a.		

**nucleótidos terminales en el extremo 5'- y en el extremo 3' que pueden hibridar entre sí (negrita)**

nt.:= nucleótidos

nucleótidos que pueden comprender principalmente un motivo de unión a SDF

i. a.:= inactivo

:= afinidad de unión igual que

193-G2-001

</<<:=afinidad de unión más débil (<), muy débil (<<) o mucho más débil (<<<) que 193-G2-001

**Comp.:**= Clones que se ensayaron como aptámeros en un ensayo de competición frente a 193-G2-001

**PD.:**=Clones que se ensayaron como aptámeros en un ensayo de unión pull-down.

**Fig. 4A**

**Derivados del Ácido Nucleico que se une a SDF de Tipo B 193-C2/G2-001**

Nombre	nt.	Secuencia : 5' -3'	Comp.	PD K <sub>b</sub> [nM]	Biacore K <sub>b</sub> [nM]
193-G2-001	47	AGCGUGGUGUGAUCUAGAUGUAUUGGCCUGAUCCUAGUCAGG <b>UACGCCU</b>		0,3	0,5
193-G2-012	45	GCGUGGUGUGAUCUAGAUGUAUUGGCCUGAUCCUAGUCAGG <b>UACGC</b>	=	0,3	
193-G2-013	45	GCGCGGUGUGAUCUAGAUGUAUUGGCCUGAUCCUAGUCAGG <b>CGCCG</b>	<<	5,3	
193-G2-014	43	GCGCGGUGUGAUCUAGAUGUAUUGGCCUGAUCCUAGUCAGG <b>GCGC</b>	<<	4,7	
193-G2-015	43	GCGCGGUGUGAUCUAGAUGUAUUGGCCUGAUCCUAGUCAGG <b>GCCCC</b>	<<<*	4,5	
193-G2-016	43	GCGCGGUGUGAUCUAGAUGUAUUGGCCUGAUCCUAGUCAGG <b>GGCC</b>	<<<*	4,2	
193-G2-017	43	GCGCGGUGUGAUCUAGAUGUAUUGGCCUGAUCCUAGUCAGG <b>GGGG</b>	<<<*	4,2	

**nucleótidos terminales en el extremo 5' y en el extremo 3' que pueden hibridar entre sí (negrita) nt.: nucleótidos**

nucleótidos que pueden comprender principalmente un motivo de unión a SDF

i.a.: = inactivo

=: = afinidad de unión igual que 193-G2-001/-012

</<</<<<: = afinidad de unión más débil (<) muy débil (<<) mucho más débil (<<<) que 193-G2-001 y 193-G2-012, respectivamente

Comp.: = Clones que se ensayaron como aptámeros en un ensayo de unión de competición frente a 193-G2-001

(\*excepto a partir de 193-G2-015,-016, -017, que se ensayaron en un ensayo de unión de competición

frente a 193-G2-012 que tiene la afinidad de unión a SDF idéntica a 193-G2-001)

PD.: = Clones que se ensayaron como aptámeros en un ensayo de unión pull-down

**Fig. 4B**

**Ácidos nucleicos que se unen a SDF-1 de Tipo C**

Nombre	nt.	Secuencia : 5' -3'	Comp.
197-B2	39	GUGCUGCGGGGGUUAGGGCUAGAAGUCGGCCUGCAGCAC	<
191-D5-001	39	AGCGUGCCGAGUUAGGGCUAGAAGUCGGUCGACACGCU	<
197-H1	39	GUGUUGCCGAGUUAGGGCUAGAAGUCGGUCACAGCAC	<
190-D3	48	CGUGCGCCUAAGAGUUAGGGCUAGAAGUCGGUCUUUGGCCAACACGG	<<
190-A3-001	48	CGUGCGCUUGAGAUAGGGUUAGGGCUAGAAGUCGGUCGAUUCUCACGG	<
190-A3-001*	48	CGUGCGCUUGAGAUAGGGUUAGGGCUAGAAGUCGGUCGAUUCUCACGG	<
190-A2	48	CGUGAUUGGUGAGGGUUAGGGCUAGAAGUCGGCCUUGUCCAGUCACGG	<<
191-A5	39	AGCCUGAAGGGUUAGGGCUAGAAGUCGGUCGACACGCU	<<
197-H3	39	GUGCUGCGGGGGUUAGGGCUAGAAGUCGGCCCGCAGCAC	<
197-B1	39	GUGUUCCTGGUUAGGGCUAGAAGUCGGCCGGCAGCAC	<<
197-E3	39	GUGUUGCAGGGUUAGGGCUAGAAGUCGGCCUGCAGCAC	<
197-H2	39	GUGCUGCGGGGGUUAGGGCUAGAAGUCGGCCUGCAGCAC	<<
197-D1	38	GUGCUGCTGGUUAGGGCUAGAAGUCGGCCGACAGCAC	<<
197-D2	39	GUGCUGUGGGGGUACAGGGCUAGAAGUCGGCCUGCAGCAC	<<
Type C Formula-1	19	GGUYAGGGCUHRXAGUCGG	
Type C Formula-2	18	GGUYAGGGCUHRAAGUCGG	
Type C Formula-3	19	GGUYAGGGCUHR-AGUCGG	
Type C Formula-4	19	GGUAGGGCUHGAAGUCGG	

**nucleótidos terminales que pueden hibridar entre sí (negrita)** [nucleótidos que pueden comprender principalmente

nt.: =nucleótidos **posición variable** un motivo de unión a SDF  
 Comp.: = Clones que se ensayaron como aptámeros en un ensayo de unión de

=: =afinidad de unión igual que 192-A10 <: =afinidad de unión más débil que 192-A10 <<: =afinidad de unión mucho más débil que 192-A10 **Fig. 5**

\*: =hibridación alternativa

**Derivados del Ácido Nucleico que se unen a SDF de Tipo C 190-A3-001**

Nombre	nt.	Secuencia : 5' -3'	Comp.
190-A3-001	48	<b>CGUGCGCUUGAGAUAGG</b> GGUUAGGGCCUAAAAGUCGGCUGAUUCUCACG	
190-A3-001*	48	CGUGCGCU <b>UGAGAUAAGG</b> GGUUAGGGCCUAAAAGUCGG <b>CUGAUUCUCA</b> CG	
190-A3-003	38	<b>UGAGAUAAGG</b> GGUUAGGGCCUAAAAGUCGGCUGAUUCUCA	=
190-A3-004	36	<b>GAGAUAAGG</b> GGUUAGGGCCUAAAAGUCGG <b>CUGAUUCUC</b>	=
190-A3-007	29	gg <b>GGUUAGGGCCUAAAAGUCGG</b> <b>CUGAUUCU</b>	<<<

**nucleótidos terminales en el extremo 5'- y en el extremo 3'- que pueden hibridar entre sí (negrita)**

nucleótidos que pueden comprender principalmente un motivo de unión a SDF

nt.:= nucleótidos

i.a.:= inactivo

:=afinidad de unión igual que 190-A3-001

</<</<<<:=afinidad de unión más débil (<), muy débil (<<) o mucho más débil (<<<) que 190-A3-001

**Comp.:**:= Clones que se ensayaron como aptámeros en un ensayo de unión de composición frente a 190-A3-001

\*:= hibridación alternativa de los nucleótidos terminales

**Fig. 6**

**Derivados del Ácido Nucleico que se unen a SDF de Tipo C 191-D5-001**

Nombre	nt.	Secuencia: 5'-3'	Comp. vs. 191-D5-001	Comp. vs. 191-D5-007	Biacore K <sub>d</sub> [nM]
191-D5-001	39	AGCGUGGCGA <b>GGUUAGGGCUAGAAGUCGG</b> UCGACACGGCU	<	<	0,73
191-D5-002	37	GCUGGCGA <b>GGUUAGGGCUAGAAGUCGG</b> UCGACACGC	=		
191-D5-003	35	CGUGGCGA <b>GGUUAGGGCUAGAAGUCGG</b> UCGACACG	=		
191-D5-004	33	CG-GCGA <b>GGUUAGGGCUAGAAGUCGG</b> UCGAC-CG	<		
191-D5-005	33	CG-GCGA <b>GGUUAGGGCUAGAAGUCGG</b> UCGCC-CG	=		
191-D5-006	31	CG--GCGA <b>GGUUAGGGCUAGAAGUCGG</b> UCGC--CG	=		
191-D5-007	29	CG--G-GA <b>GGUUAGGGCUAGAAGUCGG</b> UC-C--CG	+		0,75
191-D5-010	27	G--G-GA <b>GGUUAGGGCUAGAAGUCGG</b> UC-C--C	<		

**nucleótidos terminales en el extremo 5'- y en el extremo 3'- que pueden hibridar entre si (negrita)**

nucleótidos que pueden comprender principalmente un motivo de unión a SDF

nt.:= nucleótidos

i.a.:= inactivo

:= afinidad de unión igual que 191-D5-001/-007

</<</<<<:= afinidad de unión más débil (<<) muy débil (<<<) mucho más débil (<<<<) que 191-D5-001/007

**Comp.:=** Clones que se ensayaron como aptámeros en un ensayo de unión de competición frente a 191-D5-001 ó 191-D5-007 mientras que tienen la misma afinidad de unión a SDF que 191-D5-001.

**Fig. 7A**

**Derivados del Ácido Nucleico que se unen a SDF de Tipo C 191-D5-001**

Nombre	nt.	Secuencia : 5' -3'	Comp. vs. 191-D5-007
191-D5-007	29	CG--G-GA GGUUAGGGCUAGAAGUCGG UC-C--CG	
191-D5-010	27	G--G-GA GGUUAGGGCUAGAAGUCGG UC-C--C	<
191-D5-017	27	CCGC GGUUAGGGCUAGAAGUCGG GC GG	<
191-D5-029	27	CCCC GGUUAGGGCUAGAAGUCGG CG GG	<
191-D5-024	27	GGCG GGUUAGGGCUAGAAGUCGG CG CC	<
191-D5-017-29a	29	CCCCC GGUUAGGGCUAGAAGUCGG GC GGG	<
191-D5-017-29b	29	GCCGC GGUUAGGGCUAGAAGUCGG GC GGC	<
191-D5-019-29a	29	CCCCC GGUUAGGGCUAGAAGUCGG CG GGG	<
191-D5-024-29a	29	CGGCG GGUUAGGGCUAGAAGUCGG CG CCG	=
191-D5-024-29b	29	GGGCG GGUUAGGGCUAGAAGUCGG CG CCC	=

**nucleótidos terminales en el extremo 5' y el extremo 3' que pueden hibridar entre sí (negrita) nt.:= nucleótidos**

nucleótidos que pueden comprender principalmente un motivo de unión a SDF.i.a.:=inactivo

:=: afinidad de unión igual que 191-D5-007

<<<:= afinidad de unión más débil (<) muy débil (<<) mucho más débil (<<<) que 191-D5-007

**Comp.:=** Clones que se ensayaron como aptámeros en un ensayo de unión de competición frente a 191-D5-007

**Fig. 7B**

**Derivados del Ácido Nucleico que se unen a SDF de Tipo C 197-B2**

Nombre	nt.	Secuencia 5'-3'	Comp. vs. 197-B2	Comp. vs. 191-D5-007	Biacore K <sub>D</sub> [nM]	TAX IC <sub>50</sub> [nM]
197-B2	39	<b>GUCUGCGGG</b> GGUUAGGGCCUAGAAAGUCGG <b>CCUGCAGCAC</b>		=	0,9	0,1-0,2
197-B2-001	37	UGCUGCGGGGGUUAGGGCCUAGAAAGUCGG <b>CCUGCAGCA</b>	=		1,1	
197-B2-002	35	<b>GCUGCGGG</b> GGUUAGGGCCUAGAAAGUCGG <b>CCUGCAGC</b>	=			
197-B2-003	33	CUCGCGGGGGUUAGGGCCUAGAAAGUCGG <b>CCUGCAG</b>	=			
197-B2-004	31	UGCUGGGGGUUAGGGCCUAGAAAGUCGG <b>CCUGCA</b>	=			
197-B2-005	29	GCGGGGGUUAGGGCCUAGAAAGUCGG <b>CCUGC</b>	=			
197-B2-006	29	GCCGGGGUUAGGGCCUAGAAAGUCGG <b>CCGGC</b>	=	=		0,1-0,2
197-B2-006-31a	31	<b>GGCCGG</b> GGUUAGGGCCUAGAAAGUCGG <b>CCGGCC</b>		=		
197-B2-006-31b	31	<b>CGCCGG</b> GGUUAGGGCCUAGAAAGUCGG <b>CCGGCG</b>		=		

**nucleótidos terminales en el extremo 5'- y el 3'- que pueden hibridar entre sí (negrita)**

nucleótidos que pueden comprender principalmente un motivo de unión a SDF

i.a.: = inactivo

nt.: = nucleótidos

=: = afinidad de unión igual que 197-B2

=: = afinidad de unión igual que 191-D5-007

</<</<<< = afinidad de unión más débil (<), muy débil (<<), mucho más débil que 197-B2 o 191-D5-007 ó 191-D5-007

**Comp.:** = Clones que se ensayaron como aptámeros en un ensayo de unión de competición frente a 197-B2 ó 191-D5-007 mientras que ambos clones tienen idéntica afinidad de unión a SDF-1.

**TAX:** = Clones que se ensayaron como Spiegelmeros en un cultivo celular en un ensayo de quimiotaxis in vivo

**Fig. 8**

**Otros Ácidos Nucleicos que se unen a SDF-1**

Nombre	nt.	Secuencia : 5' -3'	PD K <sub>6</sub> [nM]
194-A2-001	48	<b>CGUGG</b> UCCGGUUGUGUCAGGGUCUAUUCGCCCGGUGCAGGGCAU <b>CCCGCG</b>	12,0
196-B12-003	49	GCAGUGUGACGGGACGGUGAUAGGACAGAGCUGAU <b>CCCGCUCAGGUGAG</b>	7,6
196-B12-004	49	CAACAGCAGUGUGACGGGACGGUGAUAGGACAGAGCUGAU <b>CCCGCUCAG</b>	5,3

**nucleótidos terminales en el extremo 5' y en el extremo 3' que pueden hibridar entre sí (negrita) nt.:= nucleótidos**

**PD.:=** Clones que se ensayaron como aptámeros en un ensayo de unión pull-down

**Fig. 9**

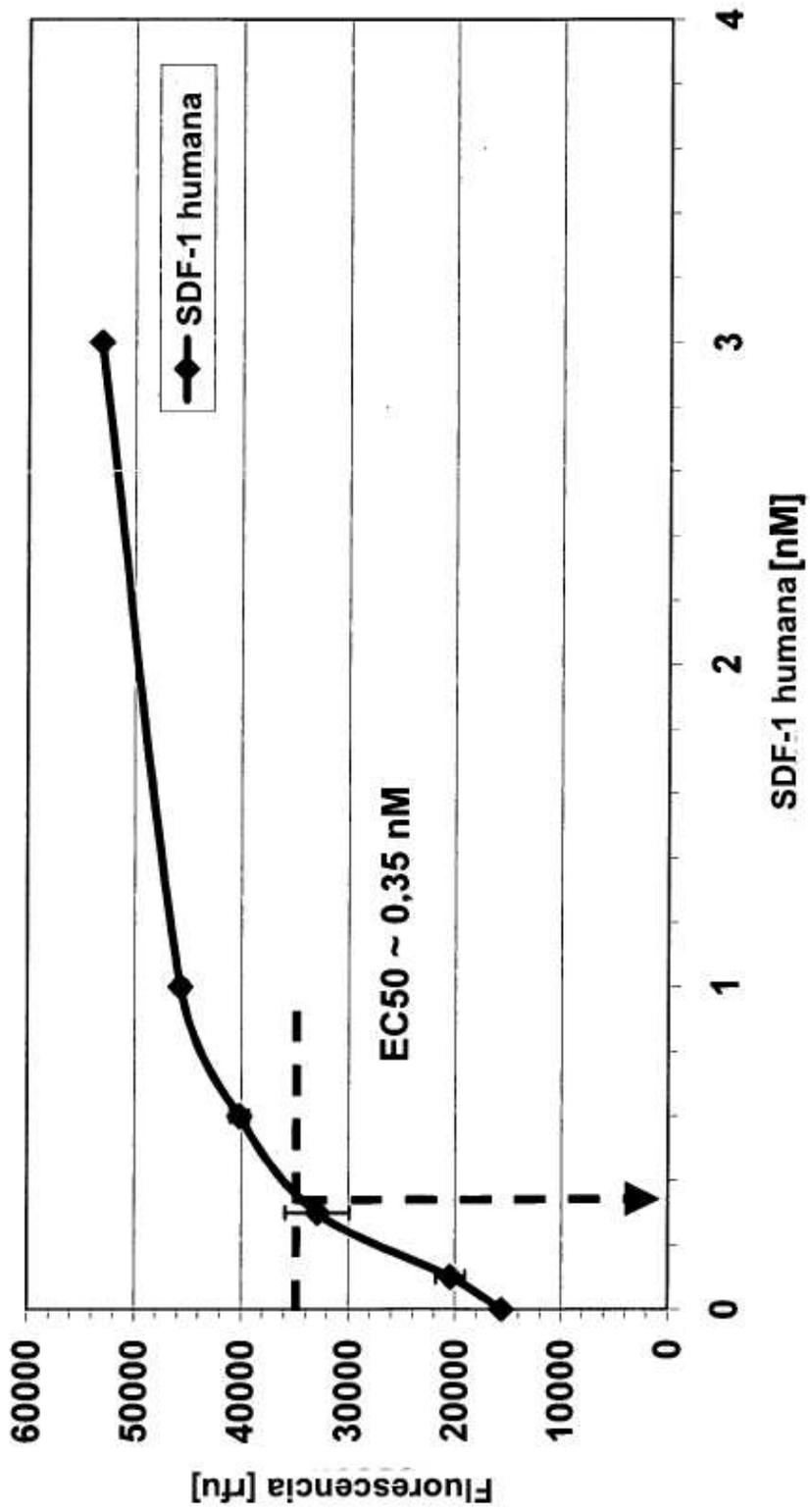


Fig. 10

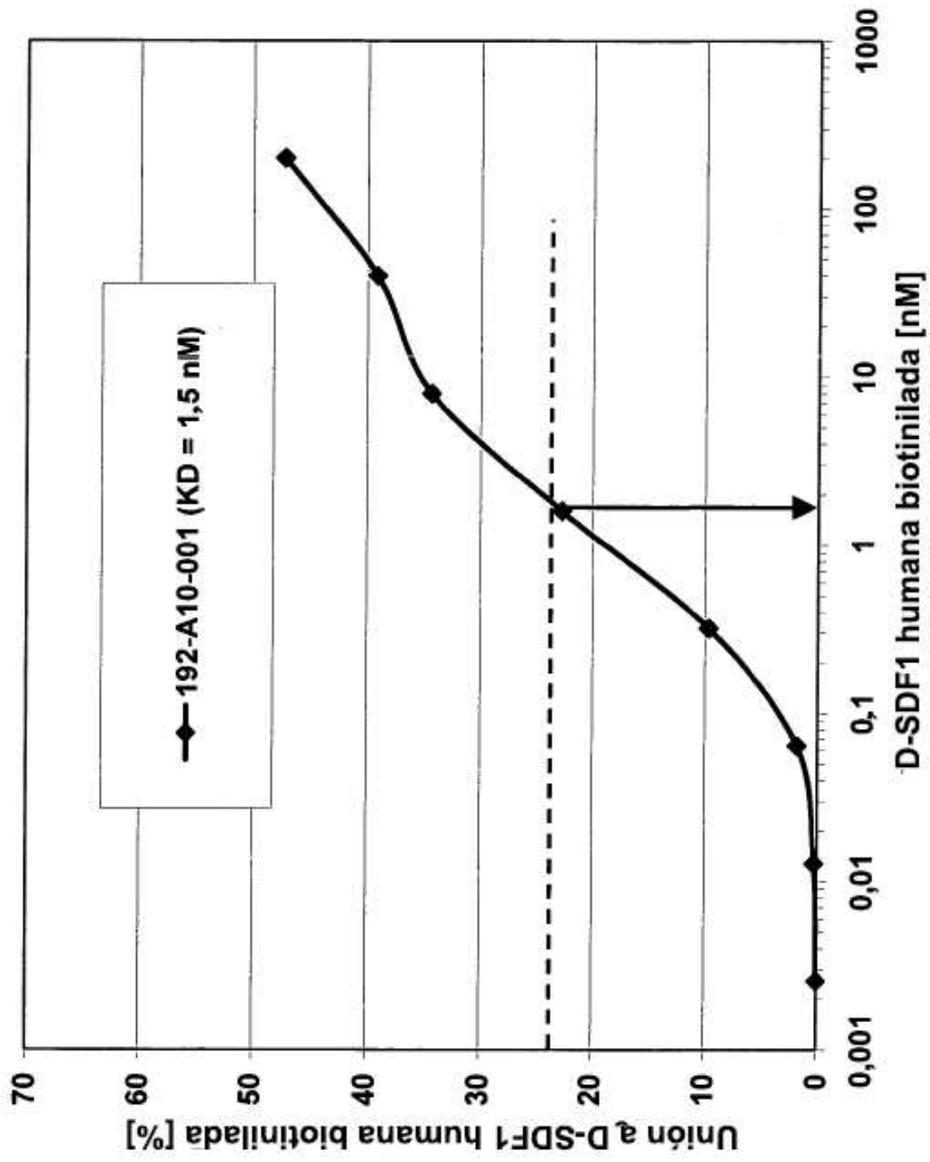


Fig. II

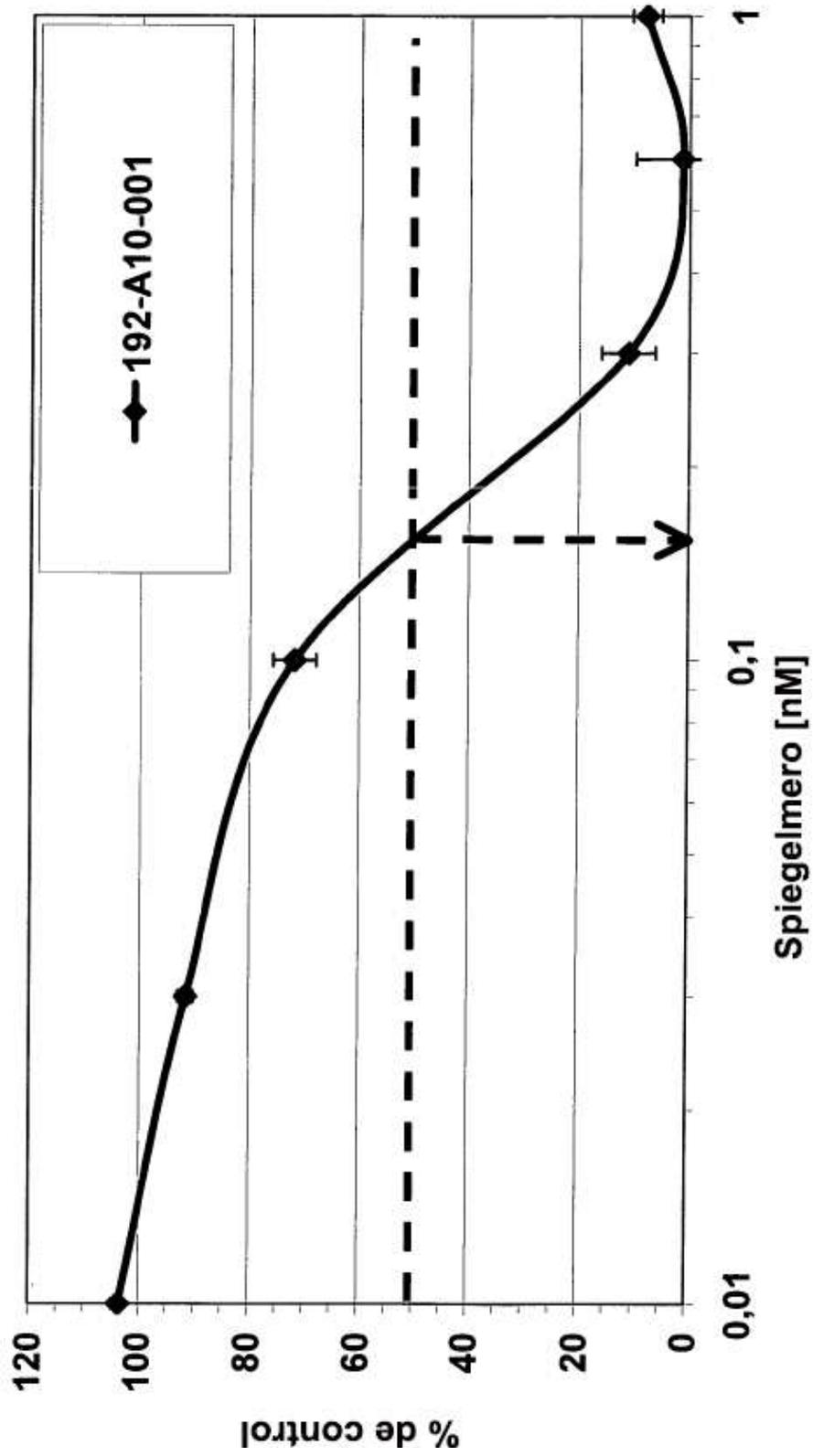
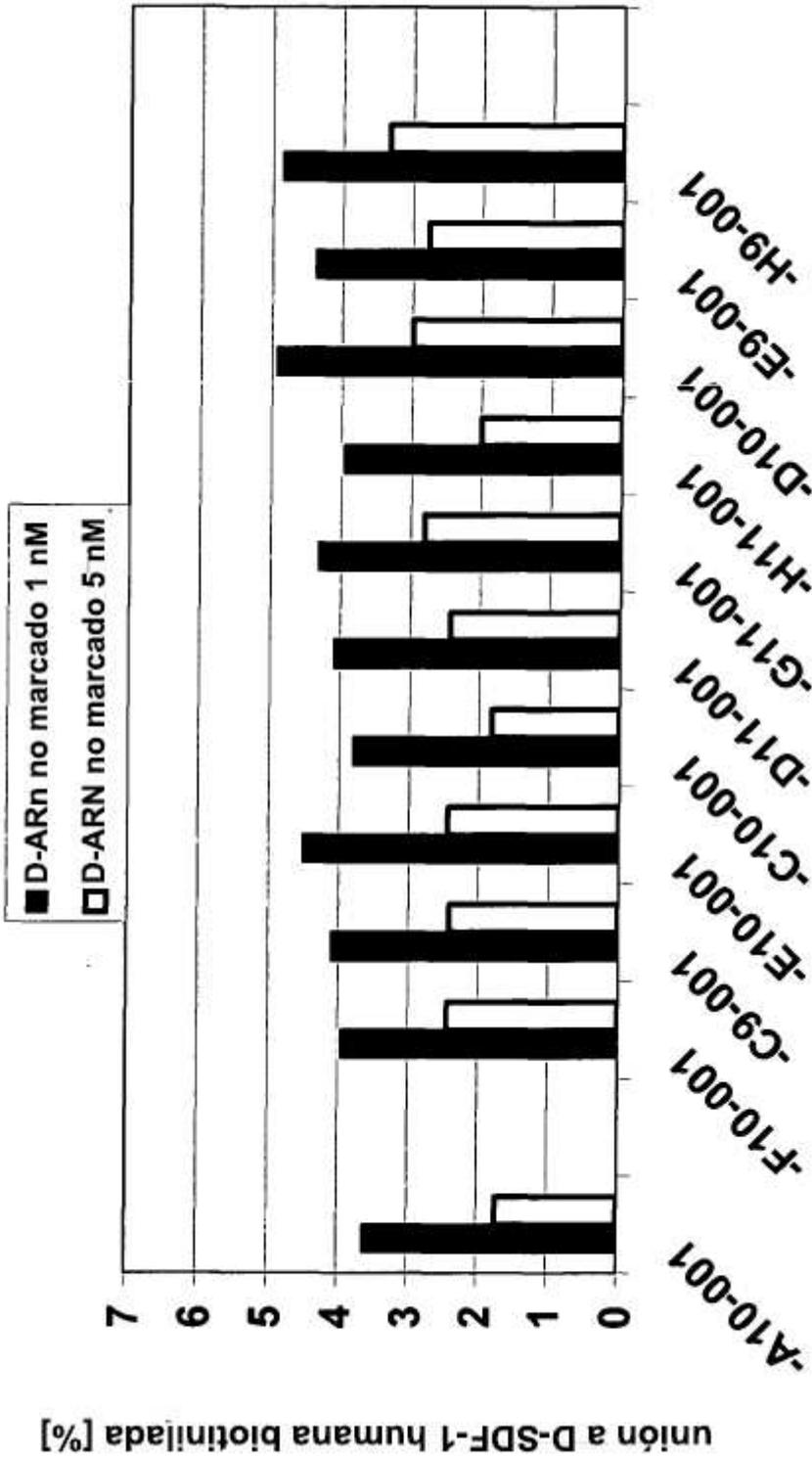


Fig. 12

Clasificación competitiva de ácidos nucleicos que se unen a SDF-1 con el aptámero 192-A10-001 marcado 0,08 nM como referencia



ácidos nucleicos que se unen a SDF-1 de Tipo A, no marcados (192-)

Fig. 13

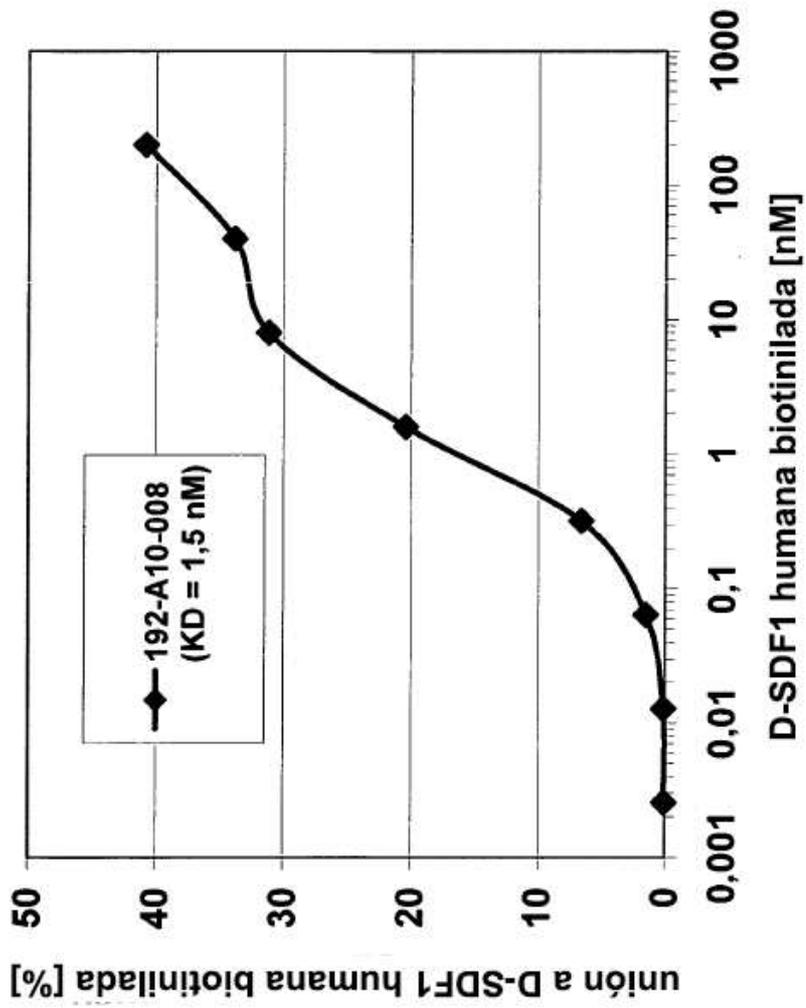
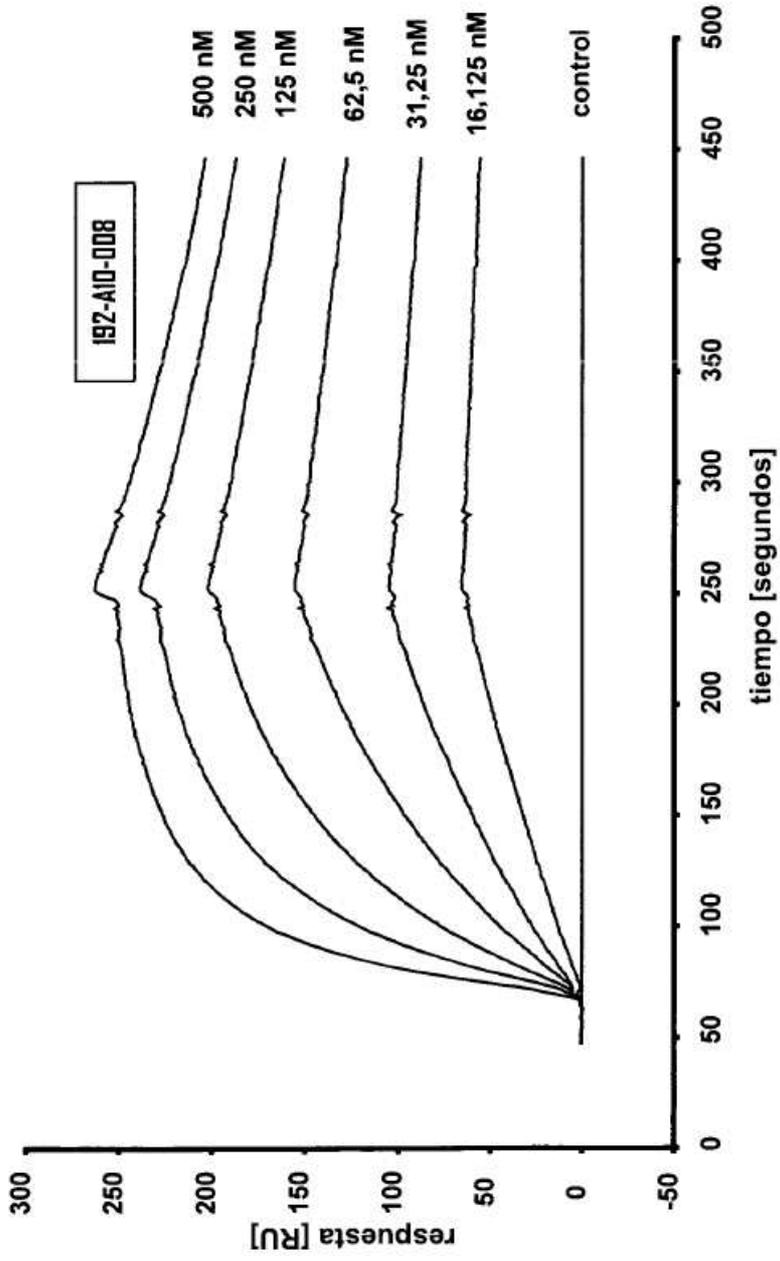


Fig. 14



Spiegelmero	$k_a$ [ $M^{-1} \times s^{-1}$ ]	$k_{off}$ [ $s^{-1}$ ]	$K_D$ [nM]
192-A10-008	$3,83 \times 10^5$	$5,35 \times 10^{-4}$	1,40

Fig. 15

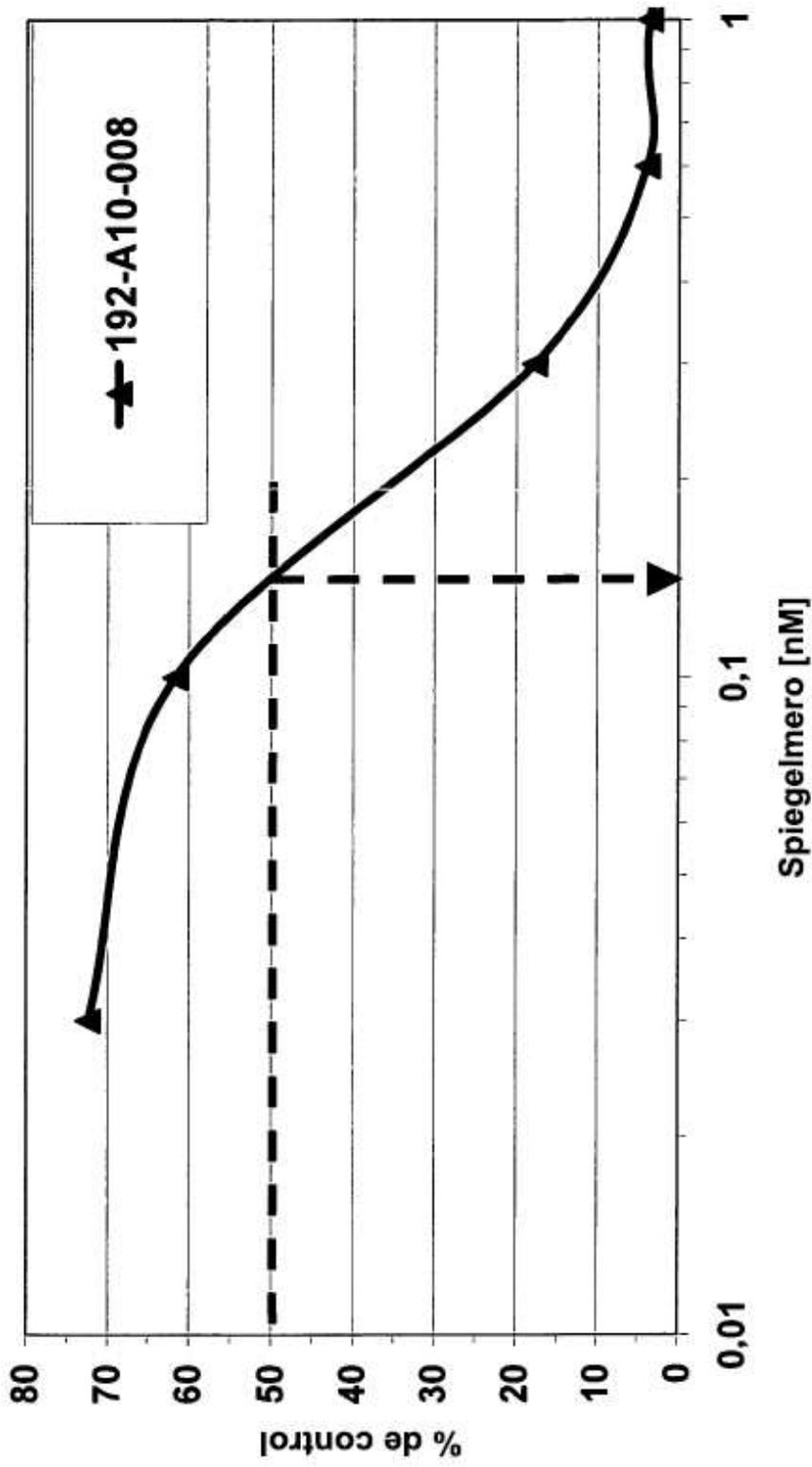


Fig. 16

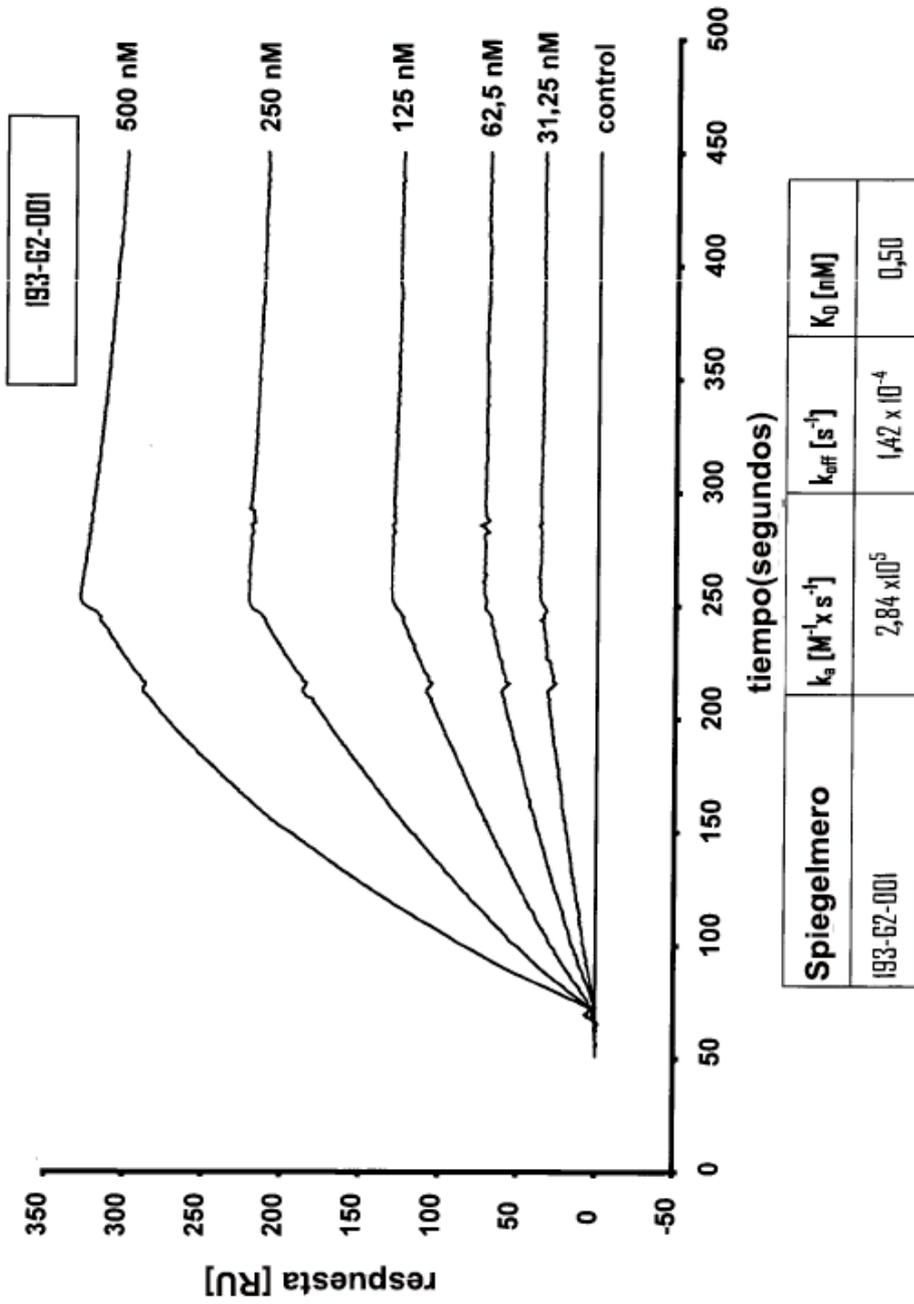


Fig. 17

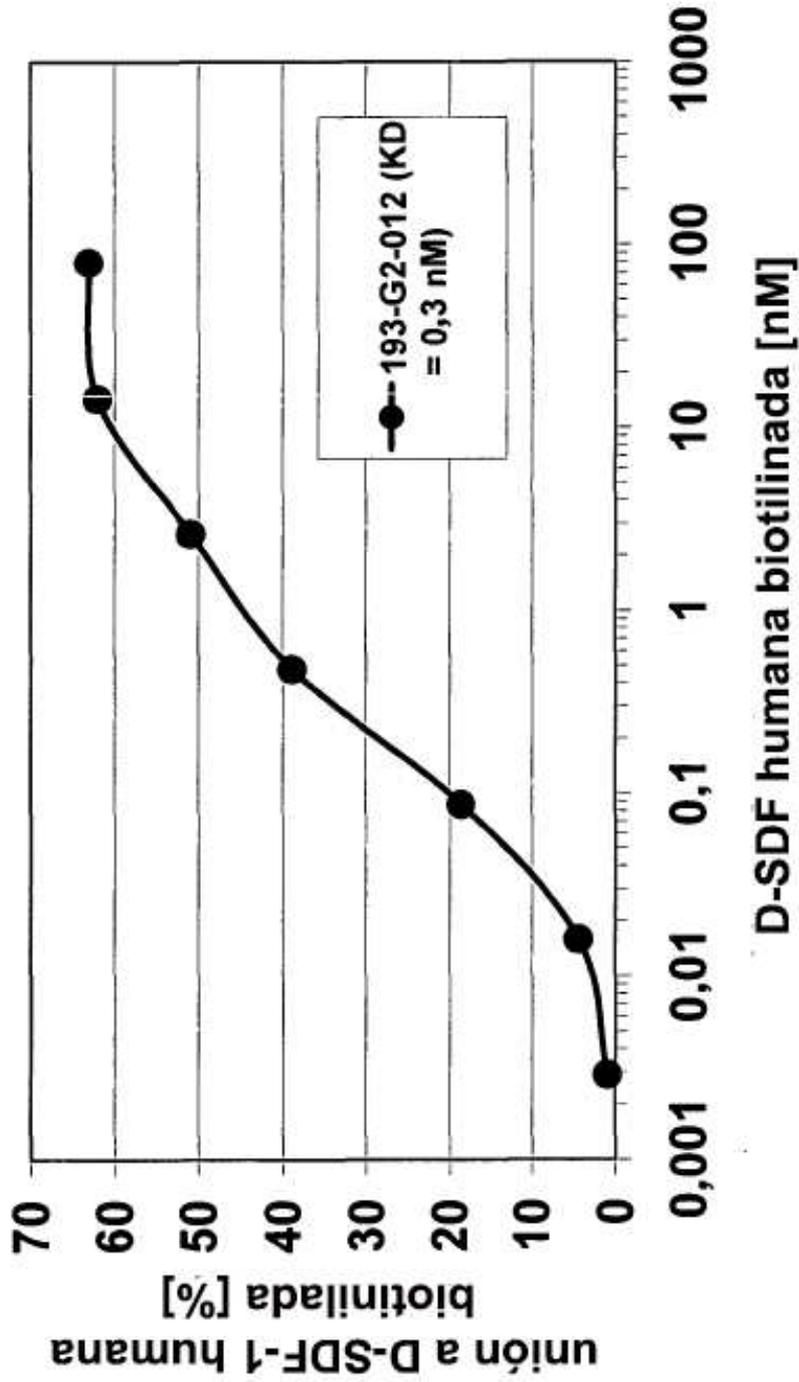


Fig. 18

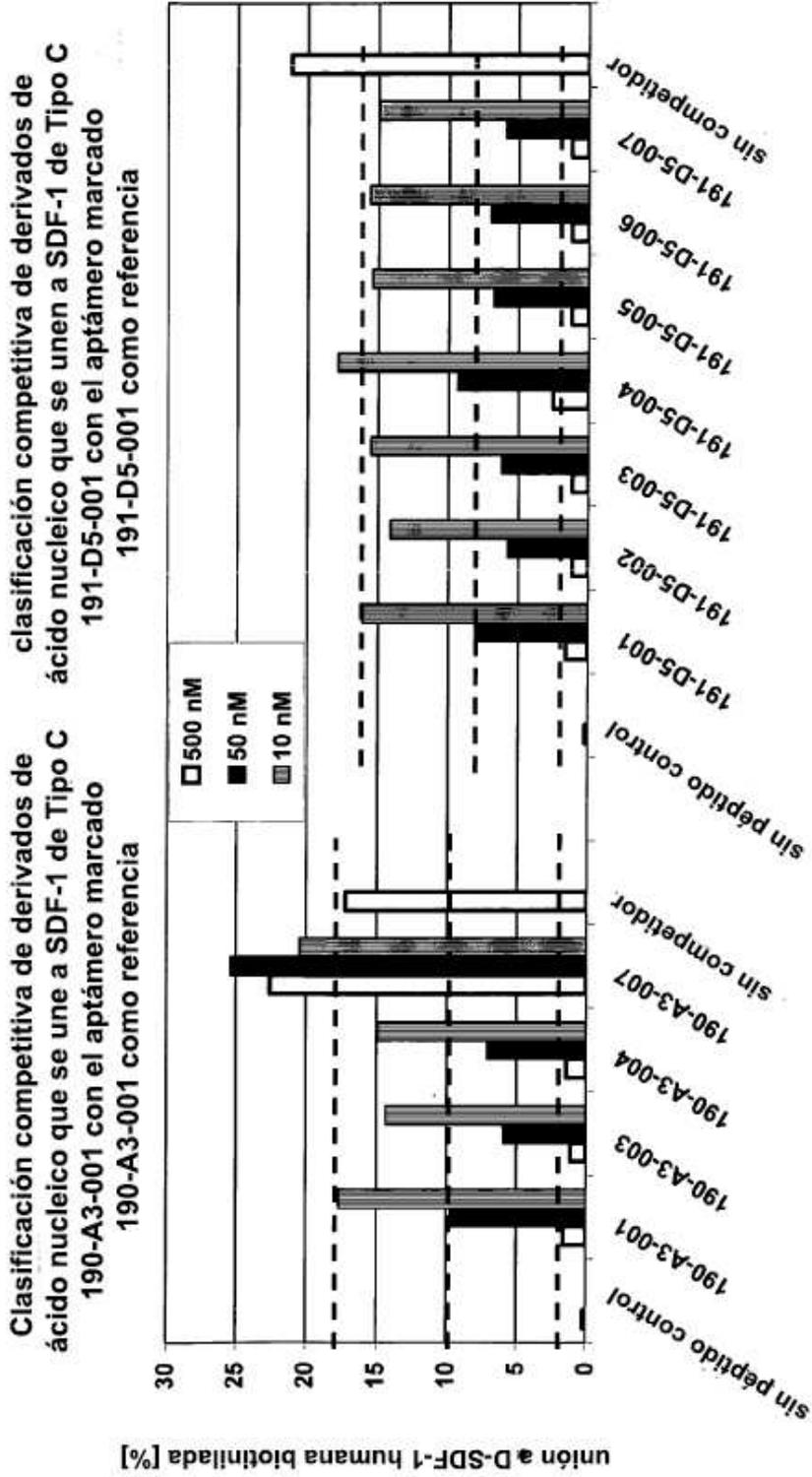


Fig. 19

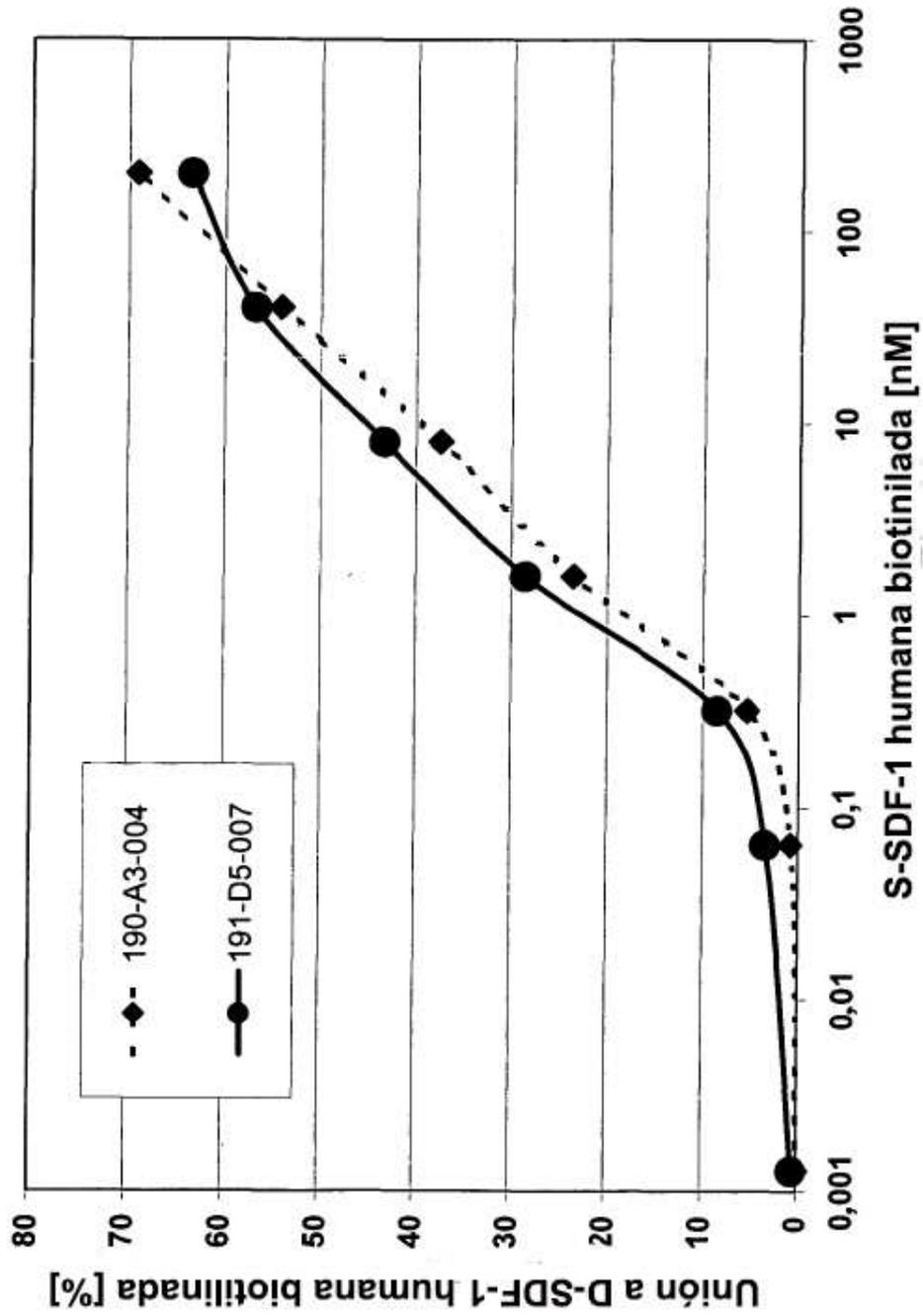


Fig. 20

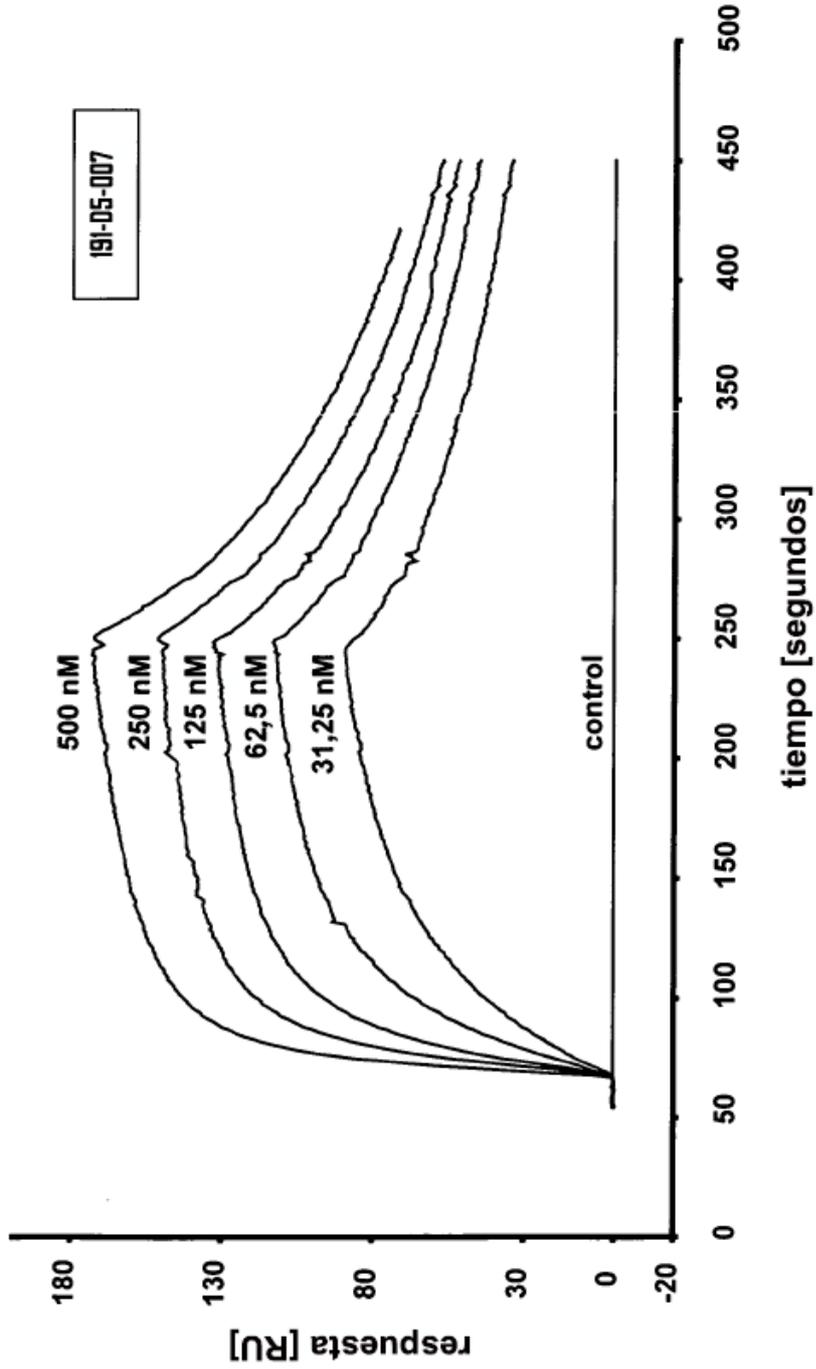


Fig. 21

Spiegelmero	$k_a$ [ $M^{-1} \times s^{-1}$ ]	$k_{off}$ [ $s^{-1}$ ]	$K_D$ [nM]
191-05-007	$2,68 \times 10^6$	$2,02 \times 10^{-3}$	0,75

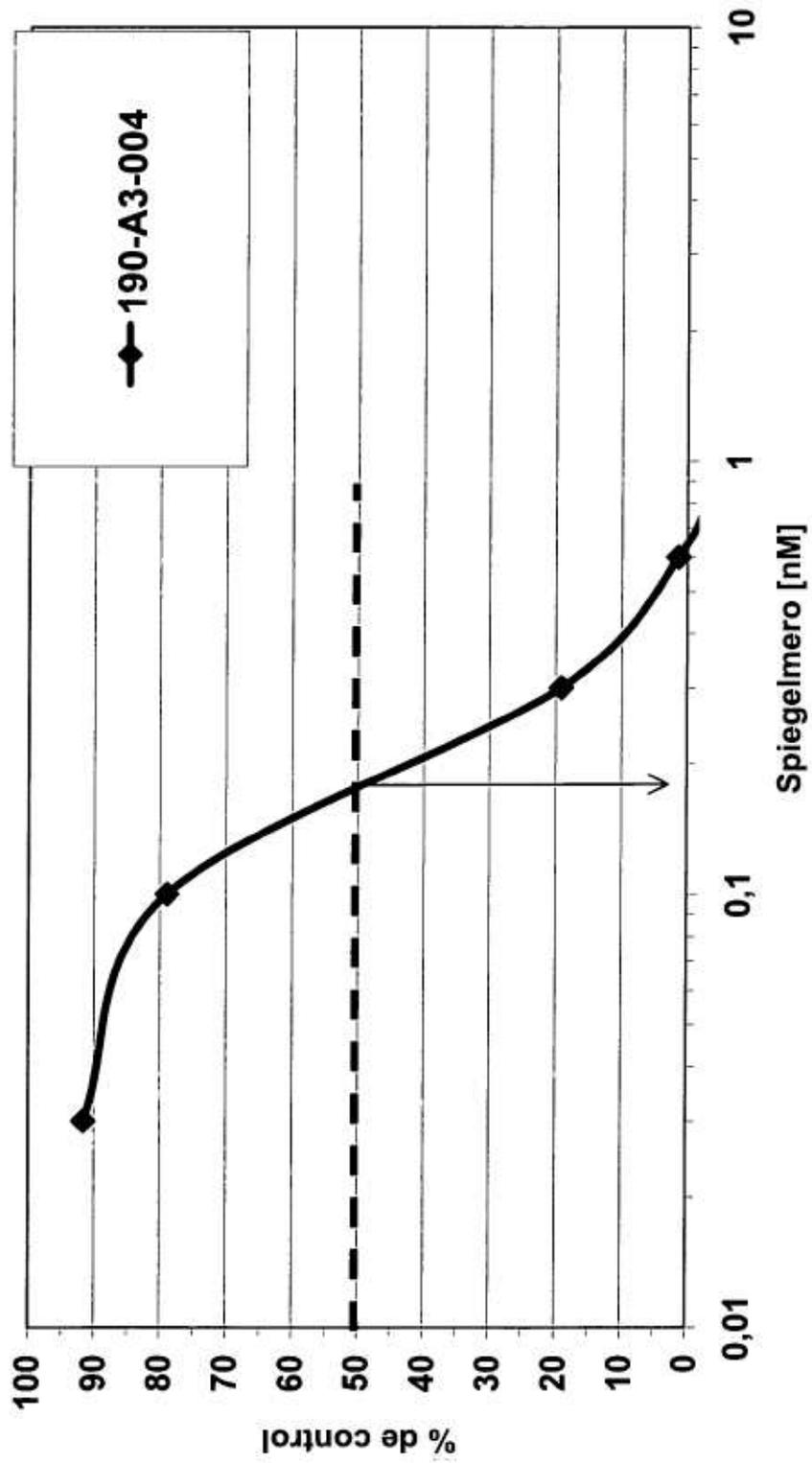


Fig. 22

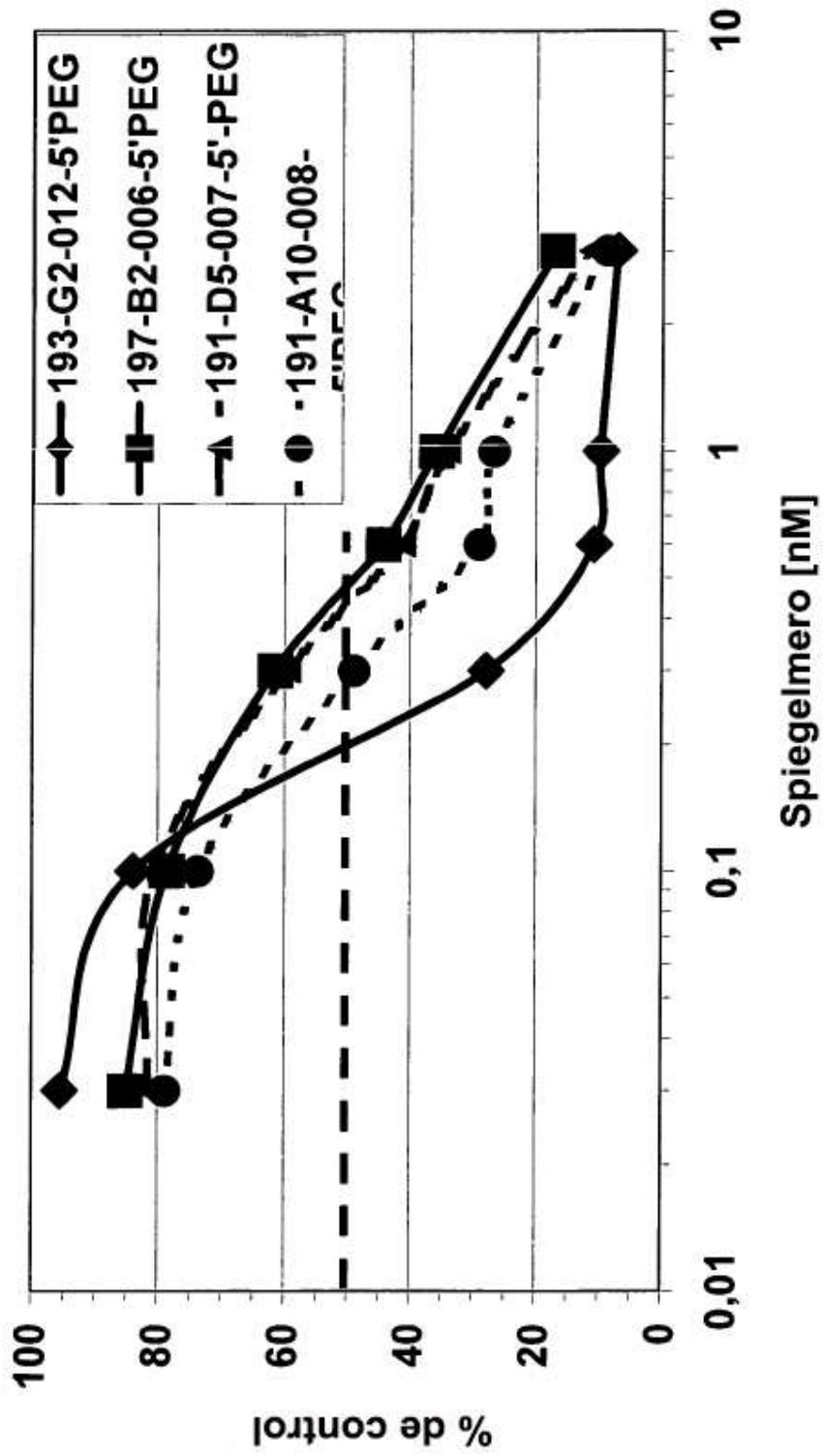


Fig. 23A

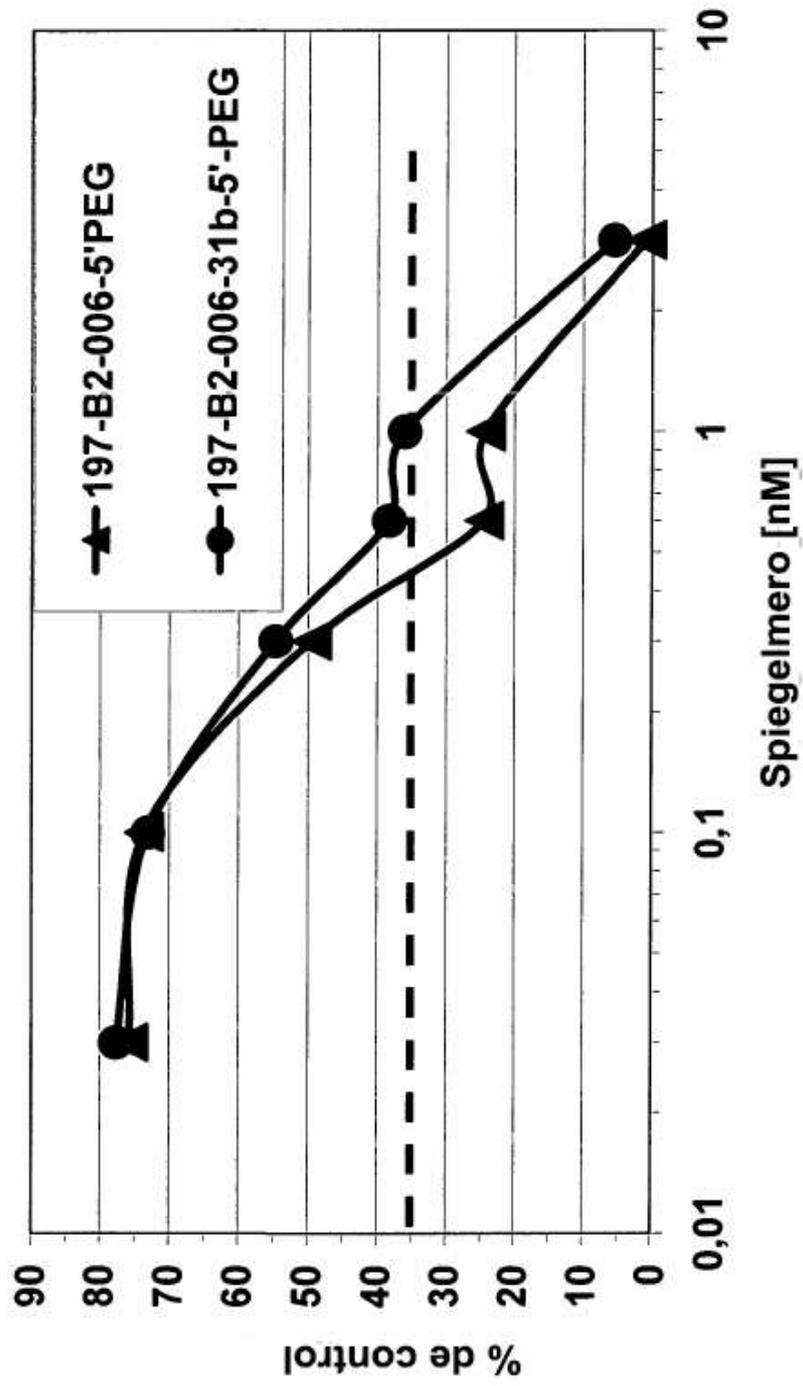


Fig. 23B

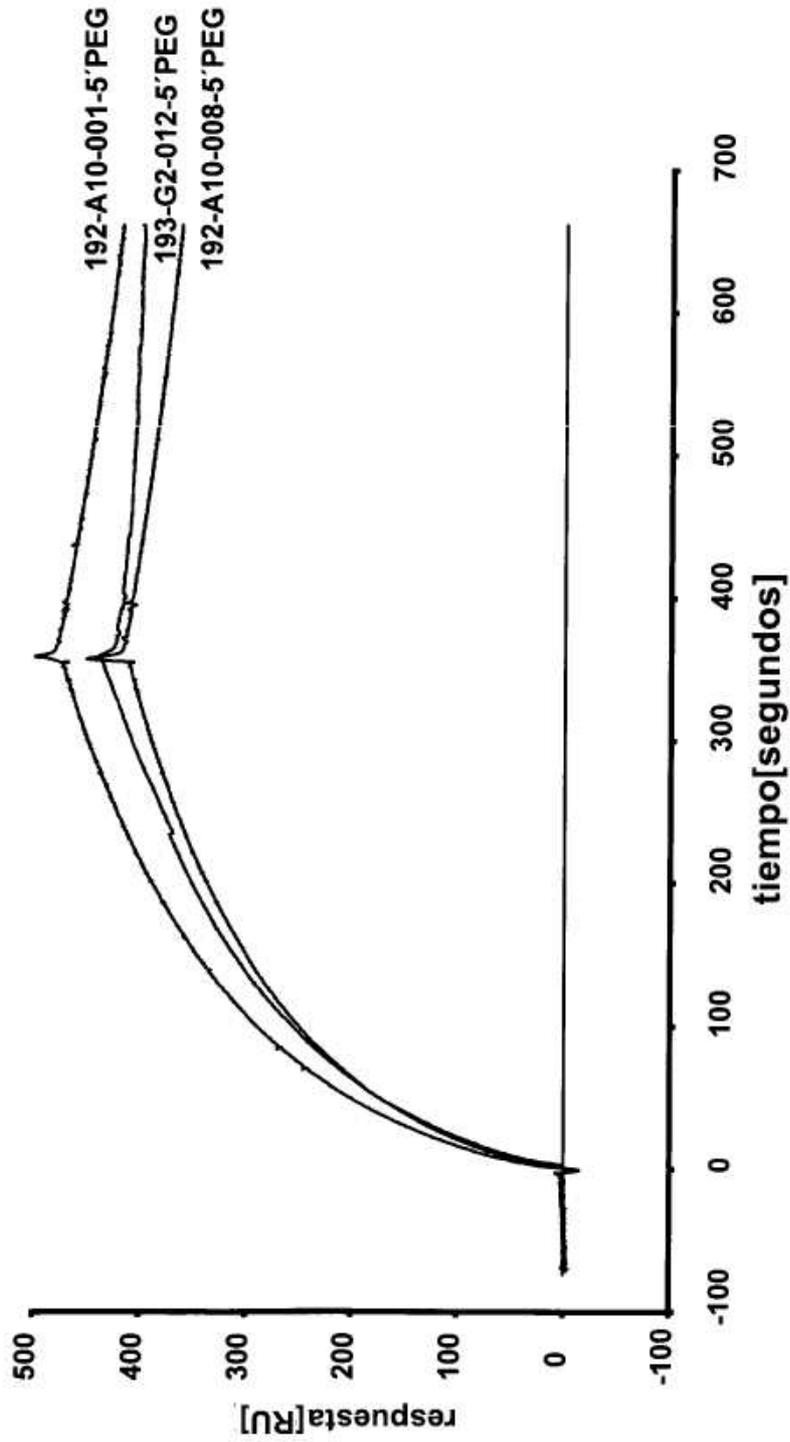
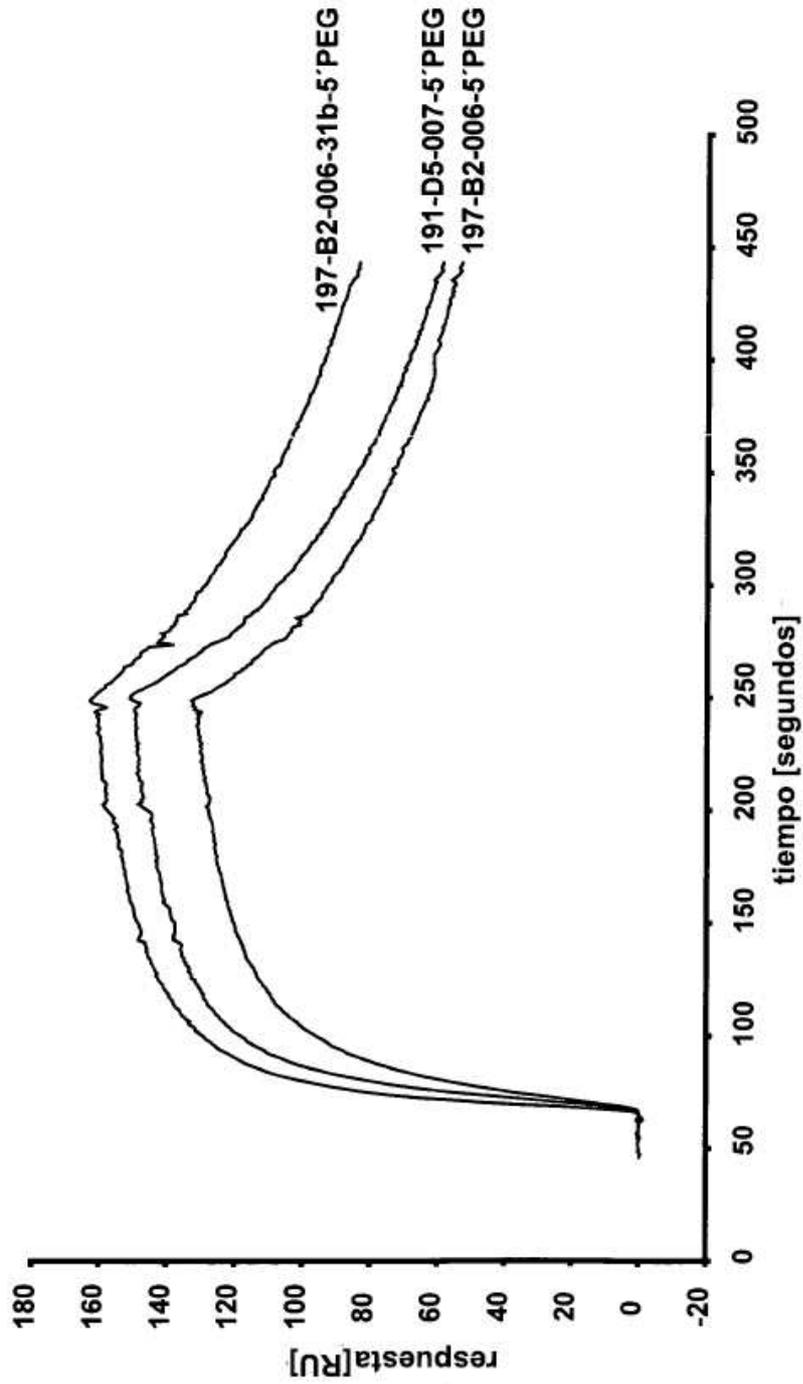


Fig. 24 A

Spiegelmero	$k_a$ [ $M^{-1} \times s^{-1}$ ]	$k_{off}$ [ $s^{-1}$ ]	$K_D$ [nM]
192-A10-001-5' PEG	$2,08 \times 10^5$	$5,32 \times 10^{-4}$	2,55
192-A10-008-5' PEG	$1,7 \times 10^5$	$6,68 \times 10^{-4}$	3,92
193-G2-012-5' PEG	$3,42 \times 10^5$	$2,52 \times 10^{-4}$	0,74



Spiegelmero	$k_b$ [ $M^{-1} \times s^{-1}$ ]	$k_{off}$ [ $s^{-1}$ ]	$K_D$ [nM]
191-D5-007-5' PEG	$1,8 \times 10^5$	$4,3 \times 10^{-3}$	2,4
197-B2-006-5' PEG	$9,05 \times 10^5$	$5,73 \times 10^{-3}$	6,3
197-B2-006-31b-5' PEG	$1,47 \times 10^6$	$4,39 \times 10^{-3}$	3,0
	$1,96 \times 10^6$	$3,02 \times 10^{-3}$	1,54

Fig. 24B

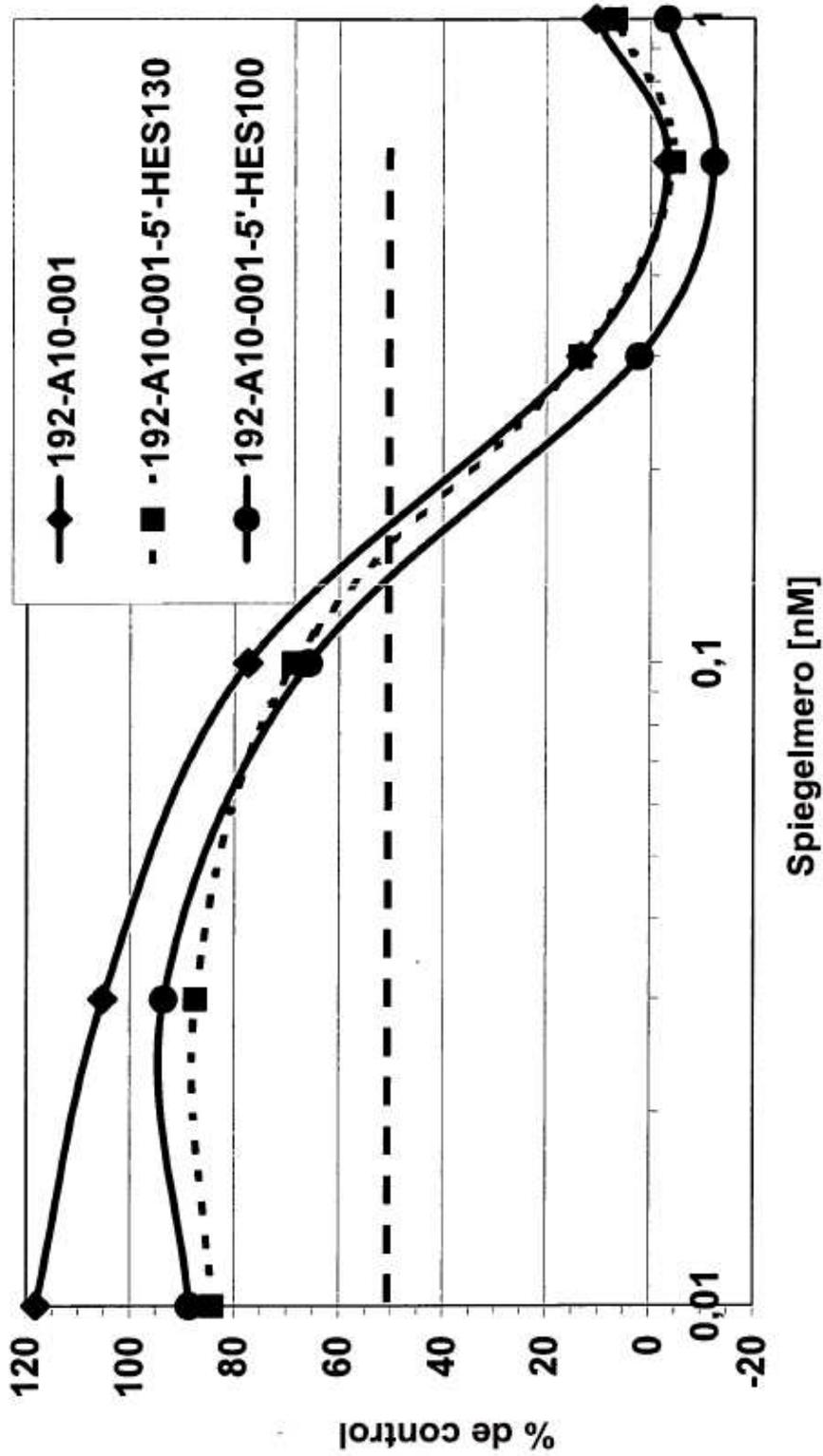


Fig. 25A

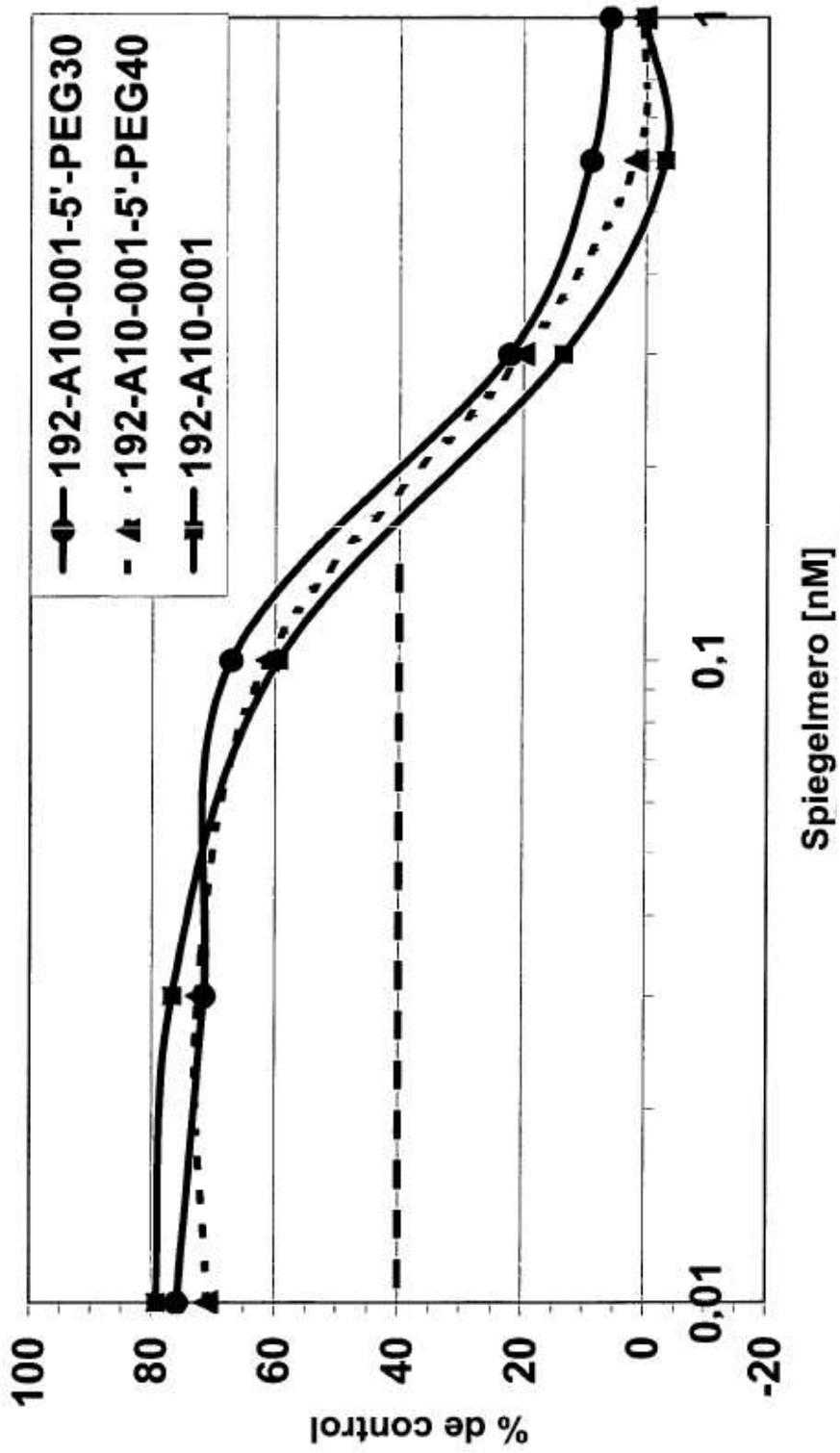


Fig. 25B

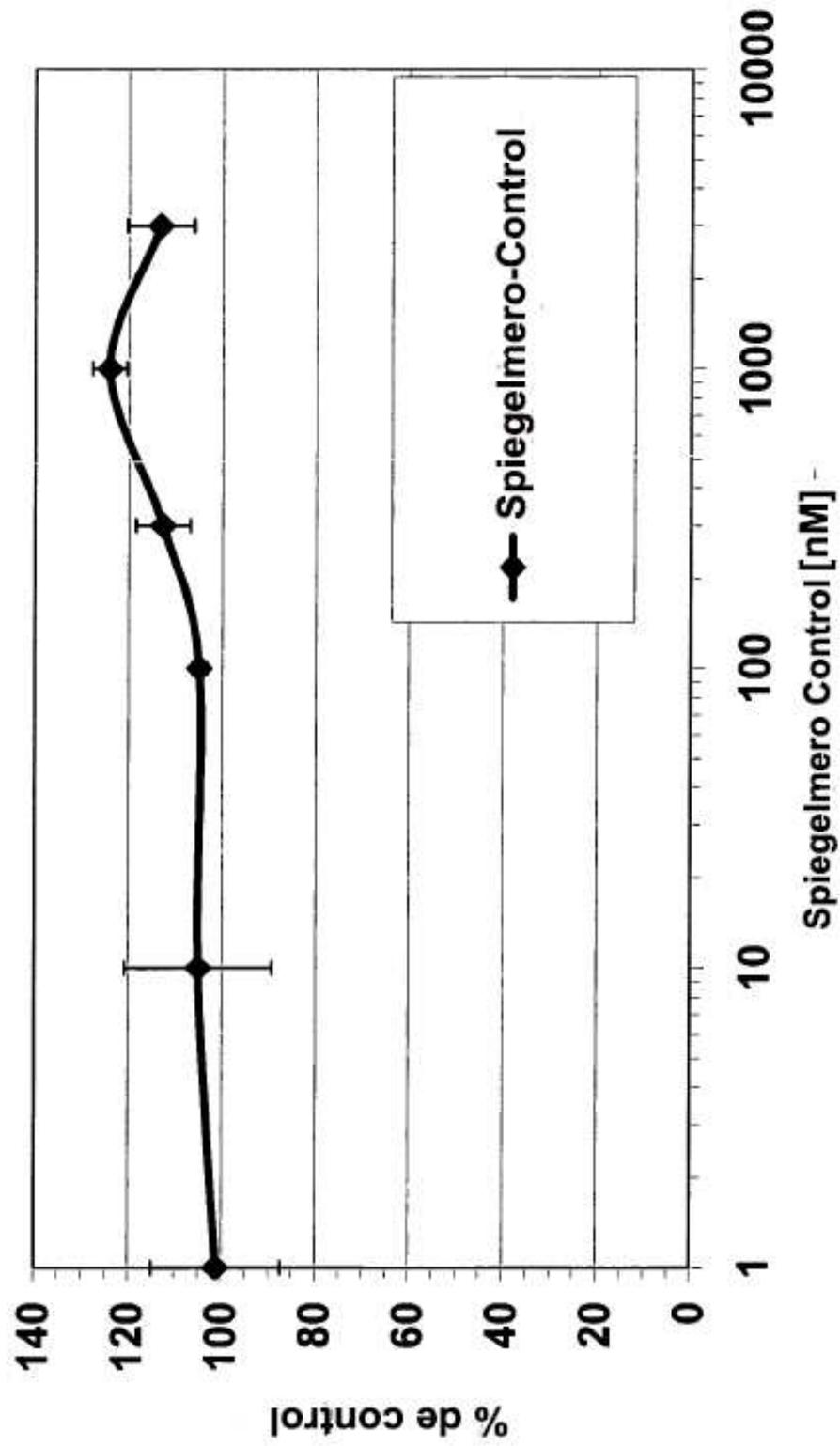


Fig. 26

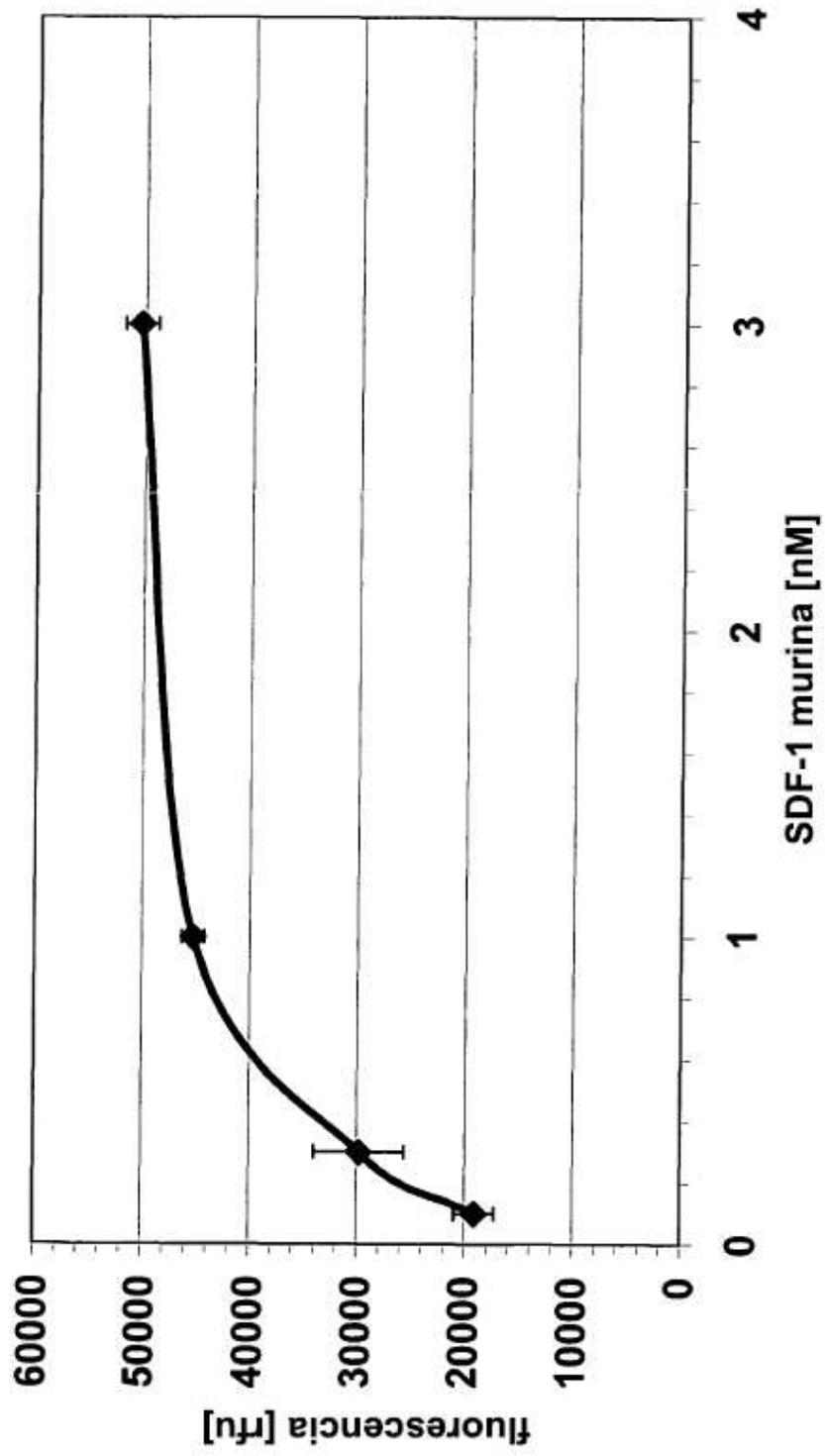


Fig. 27

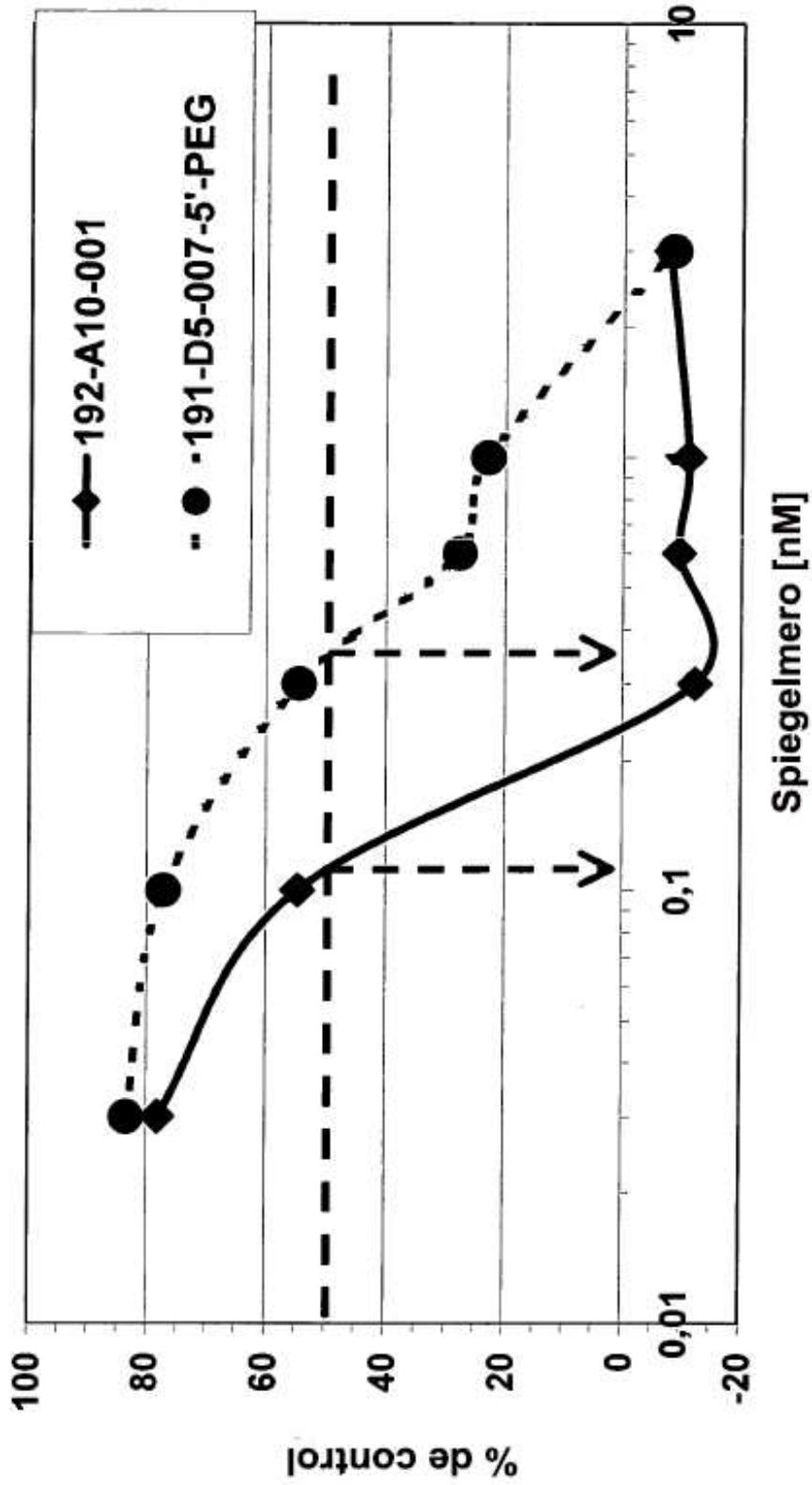


Fig. 28

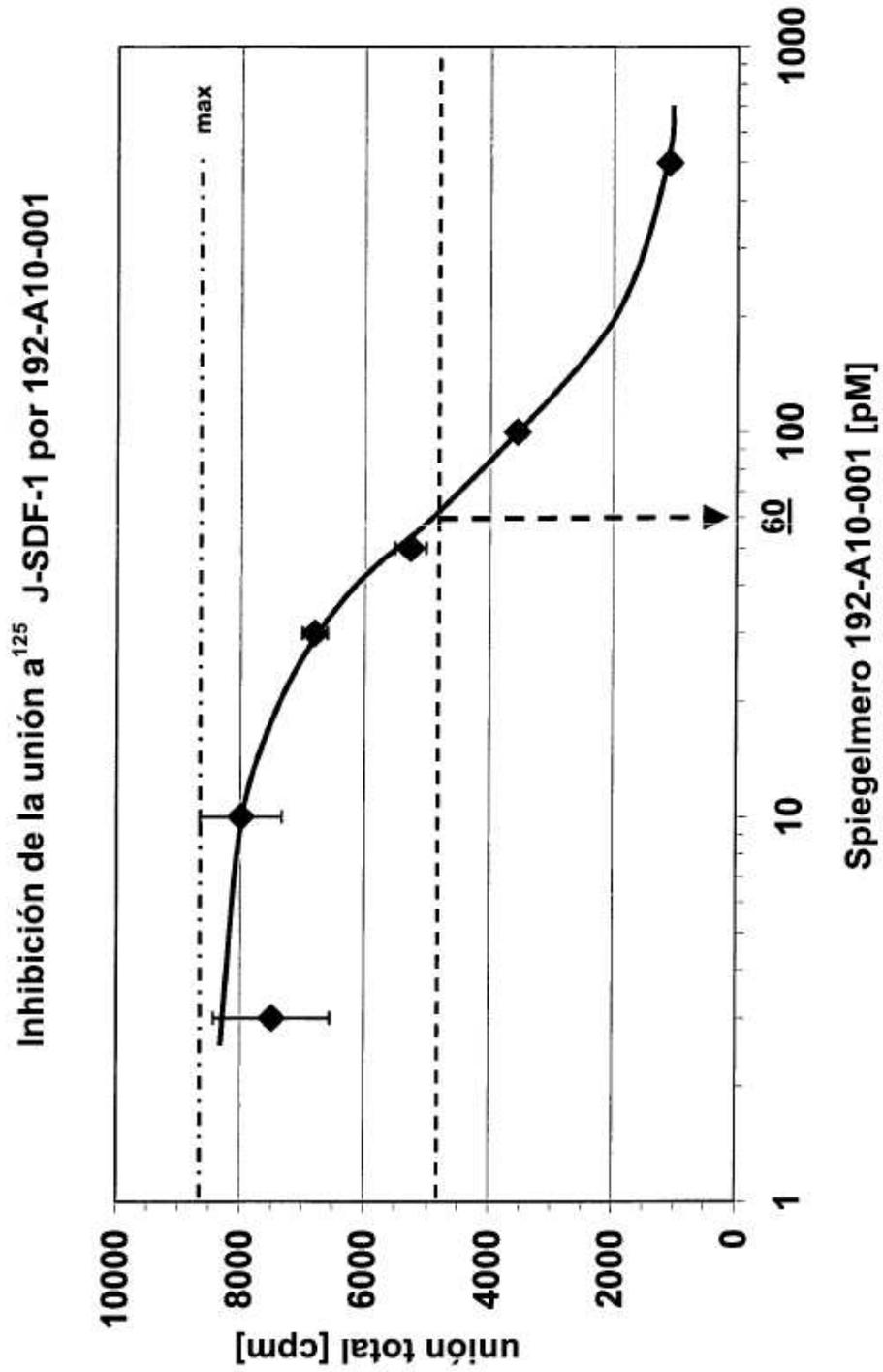
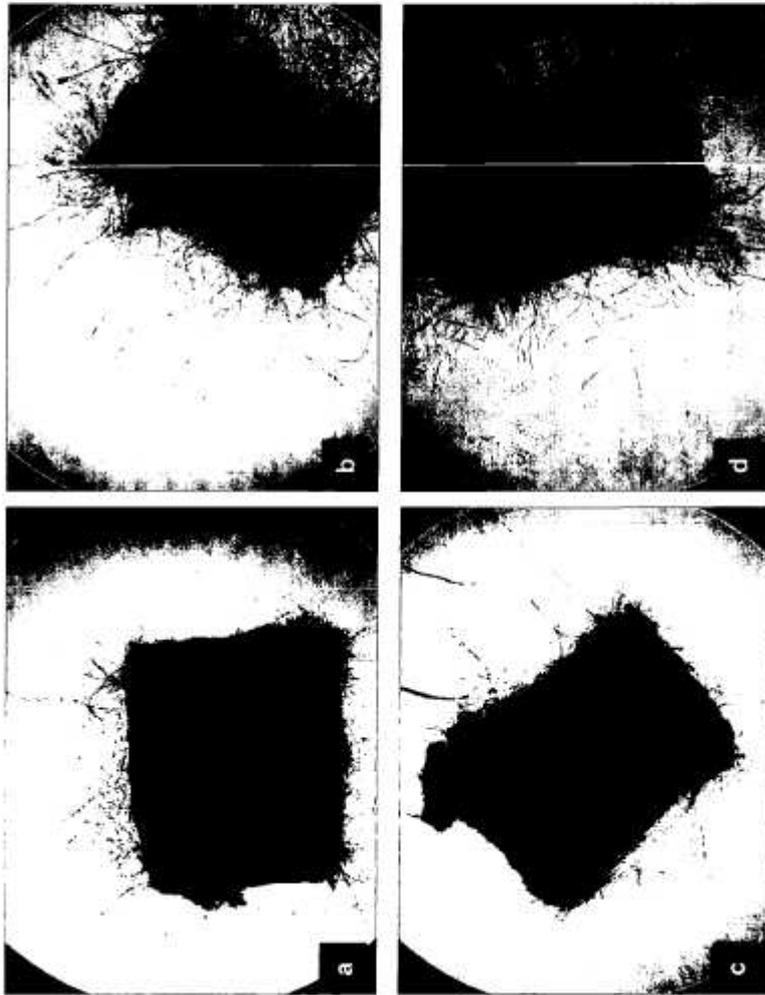


Fig. 29

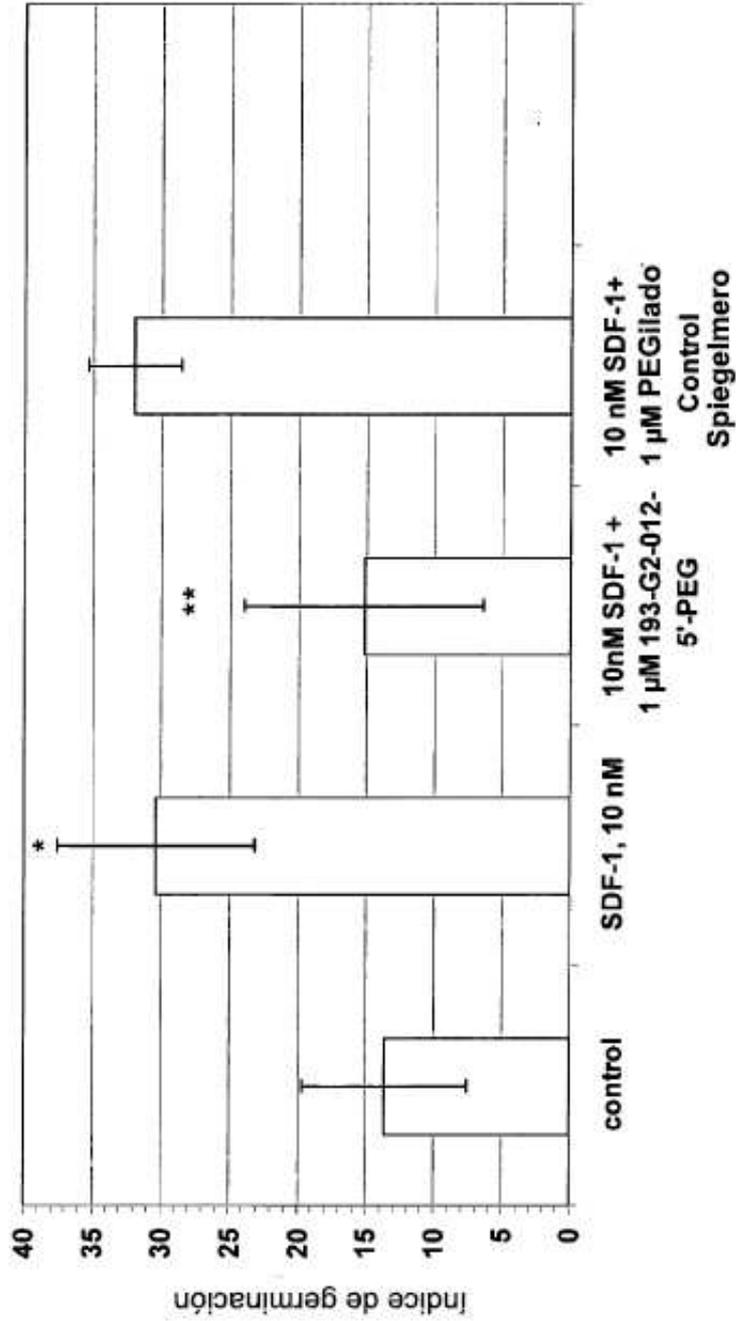


<b>SDF-1 [nM]</b>	<b>1,0</b>	<b>1,0</b>	<b>1,0</b>	<b>1,0</b>	<b>1,0</b>	<b>1,0</b>
<b>192-A10-001 [nM]</b>	<b>0</b>	<b>0,1</b>	<b>0,3</b>	<b>1,0</b>	<b>3,0</b>	<b>3,0</b>

**Fig. 30**



**Fig. 31**: SDF-1 induce a la germinación en un ensayo de germinación del anillo aórtico. Anillos de la aorta de rata se incorporaron en una matriz de colágeno y se incubaron durante 6 días con SDF-1 con o sin Spiegelmeros. **a**: control; **b**: SDF-1 10 nM; **c**: SDF-1 10 nM + 193-G2-012-5'-PEG; 1μM; **d**: SDF-1 10nM + Spiegelmero control PEGilado 1μM



**Fig. 32: Germinación inducida por SDF-1 y bloqueo de la misma por Spiegelmeros en un ensayo de germinación del anillo aórtico.** Anillos de la aorta de rata se incorporaron en una matriz de colágeno y se incubaron durante 6 días con SDF-1 con o sin Spiegelmeros. Los índices de germinación se muestran como la media +/- de la DE para 5 anillos por condición. \*: el valor para SDF-1 es significativamente diferente del control (ensayo de Mann-Whitney; p=0,009); \*\*: el valor para SDF-1+ 193-G2-012-5'-PEG es significativamente diferente del de SDF-1 (ensayo de Mann-Whitney; p=0,028)

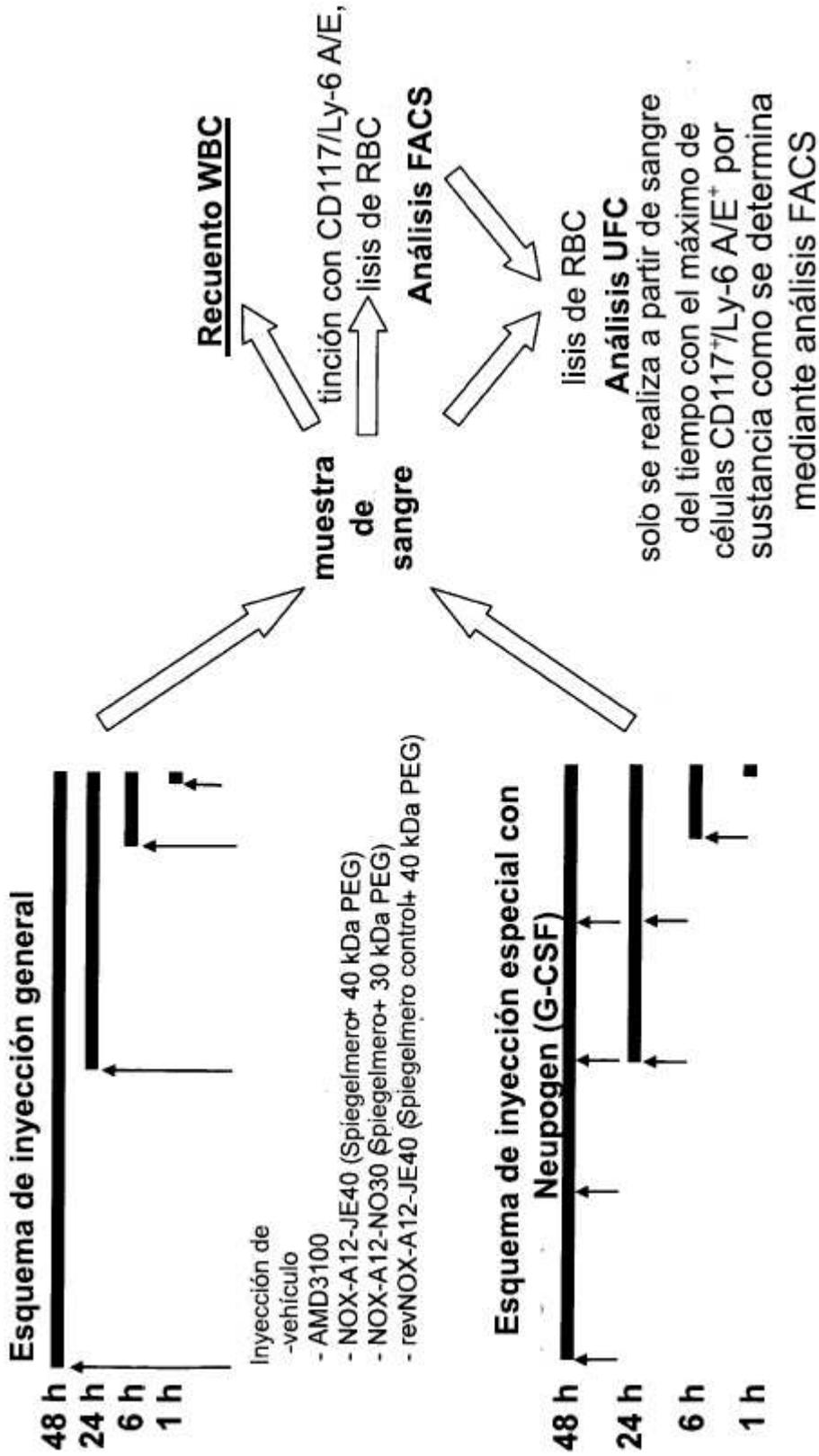


Fig. 33

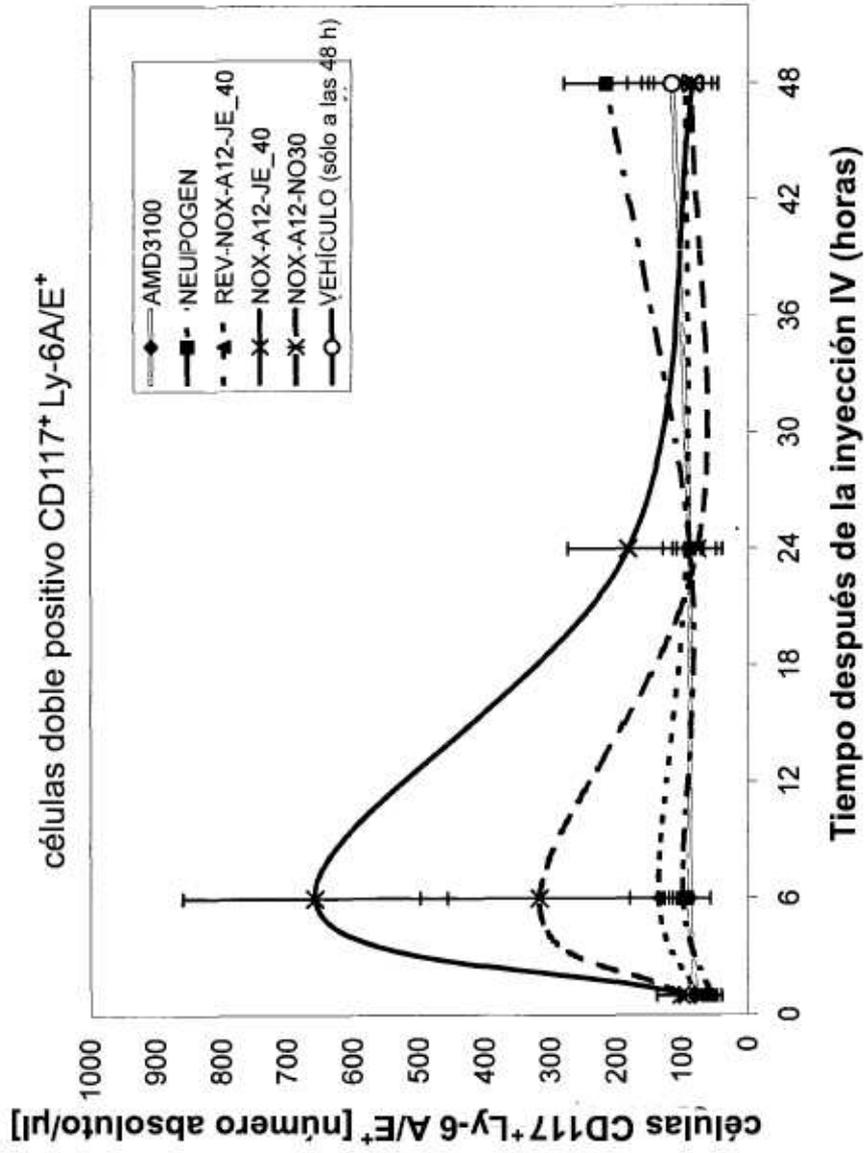


Fig. 34

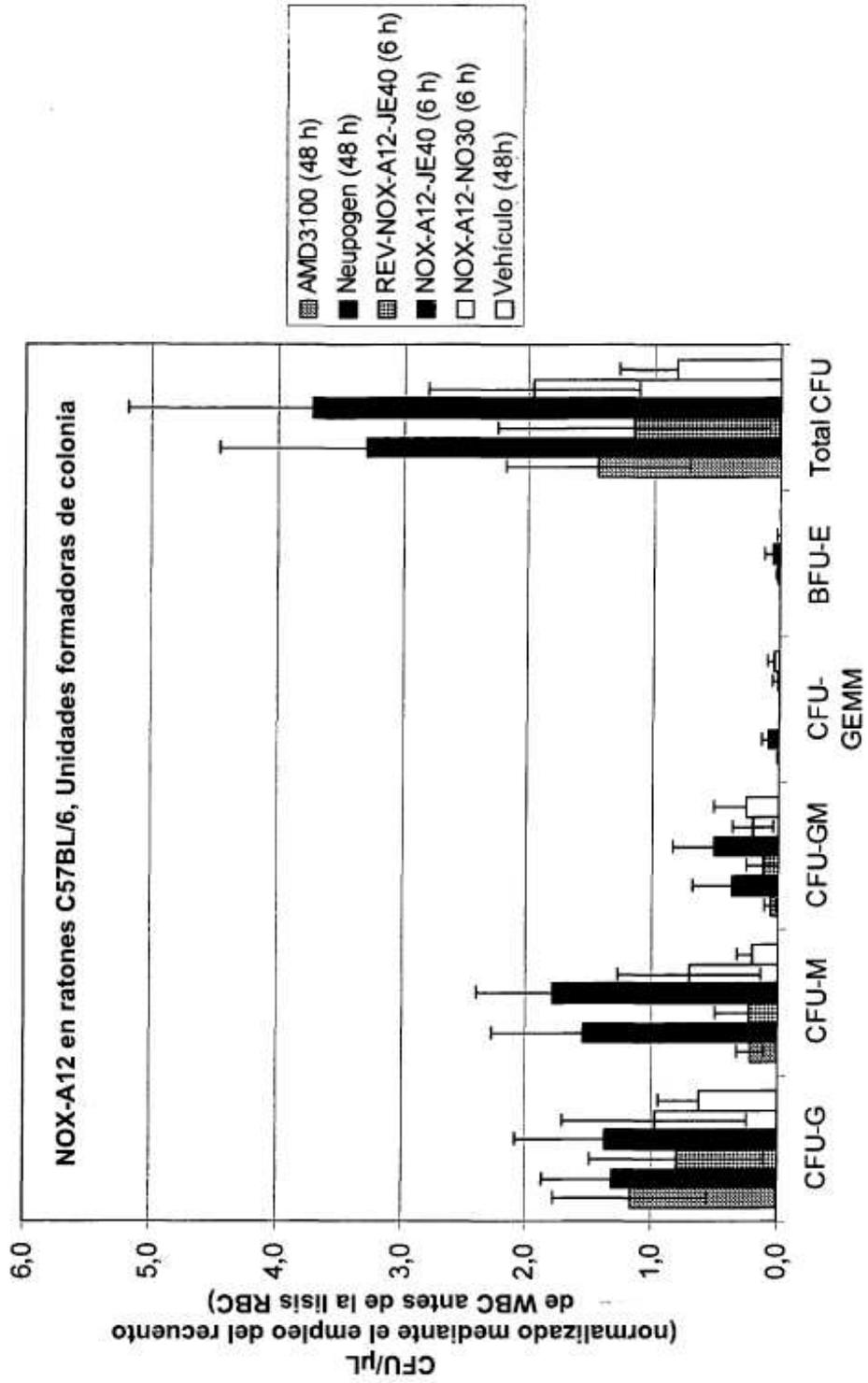
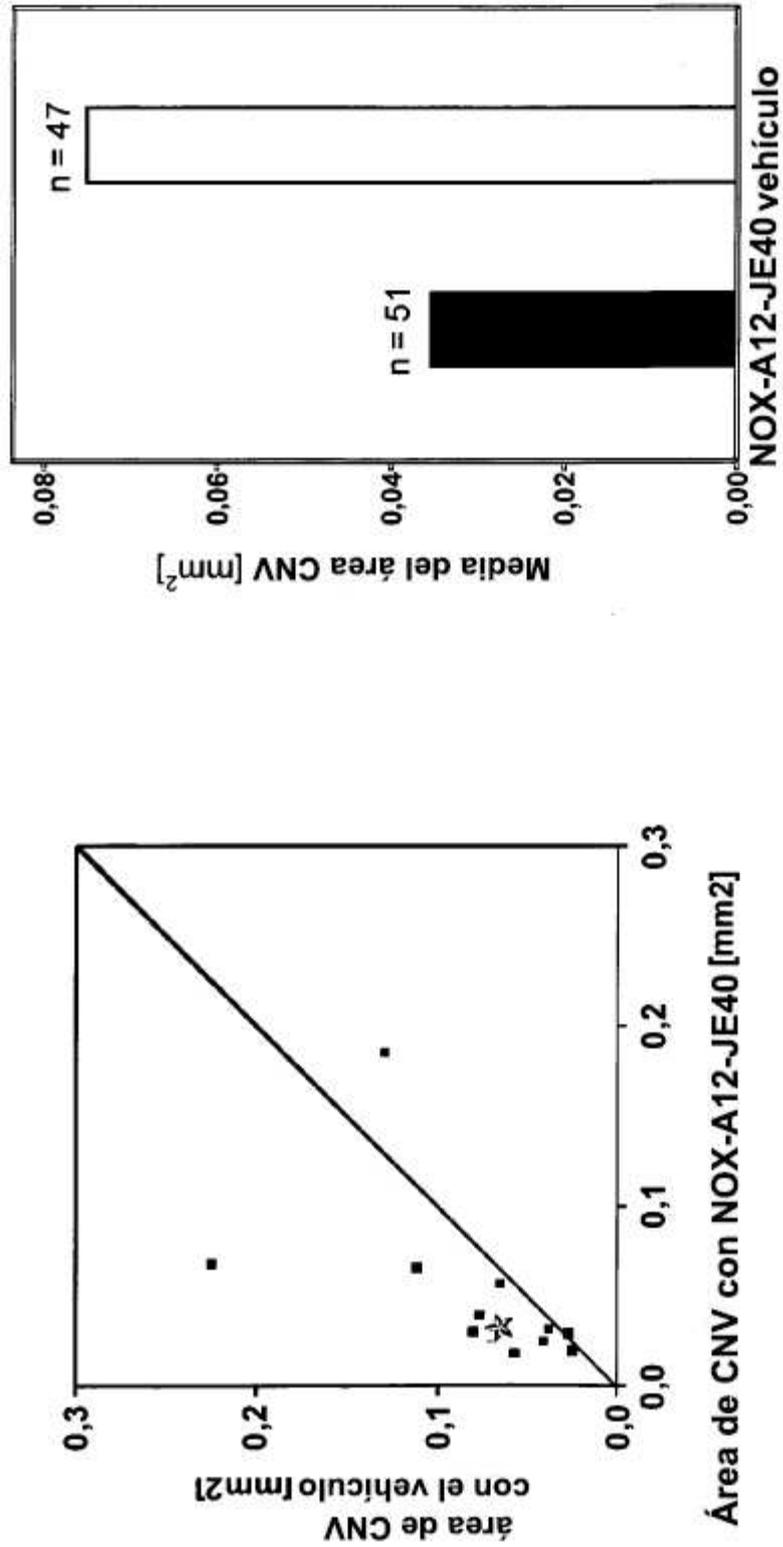
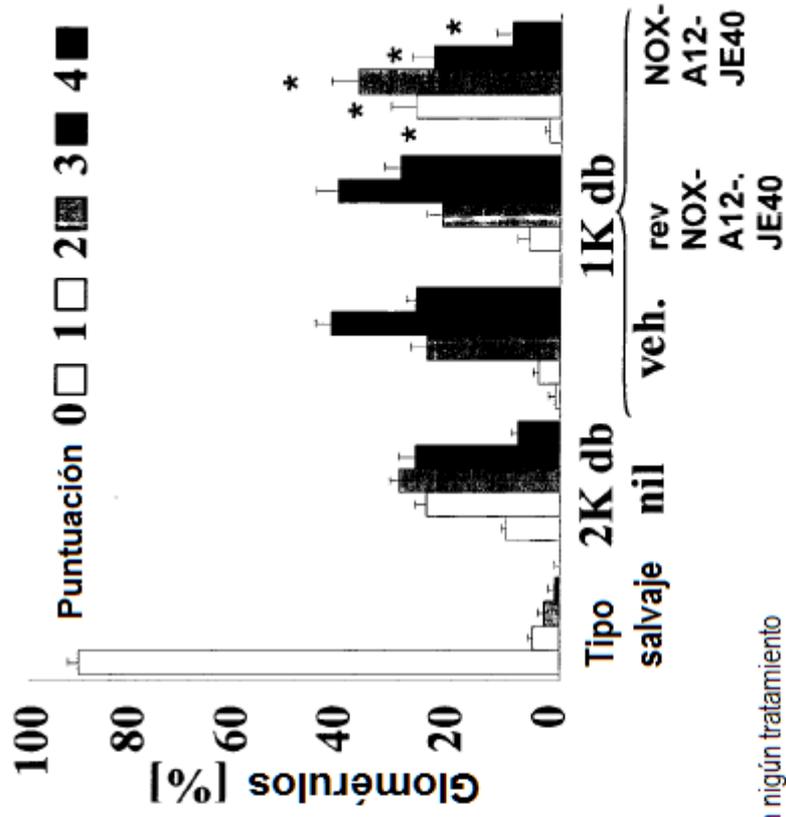


Fig. 35



n=número de quemaduras por láser evaluadas por grupo

Fig. 36



**Tipo salvaje**= Ratones de tipo salvaje sin ningún tratamiento

**2K db nil** = Ratones diabéticos con dos riñones sin ningún tratamiento

**1K db** = Ratones diabéticos después de uninefroctomía (1 riñón izquierdo)

**veh.** = vehículo tratado (5% glucosa para inyección)

**Puntuación 0-4**= Puntuación de glomerulosclerosis de 0 = sano a 4 = completamente fibrótico

Fig. 37

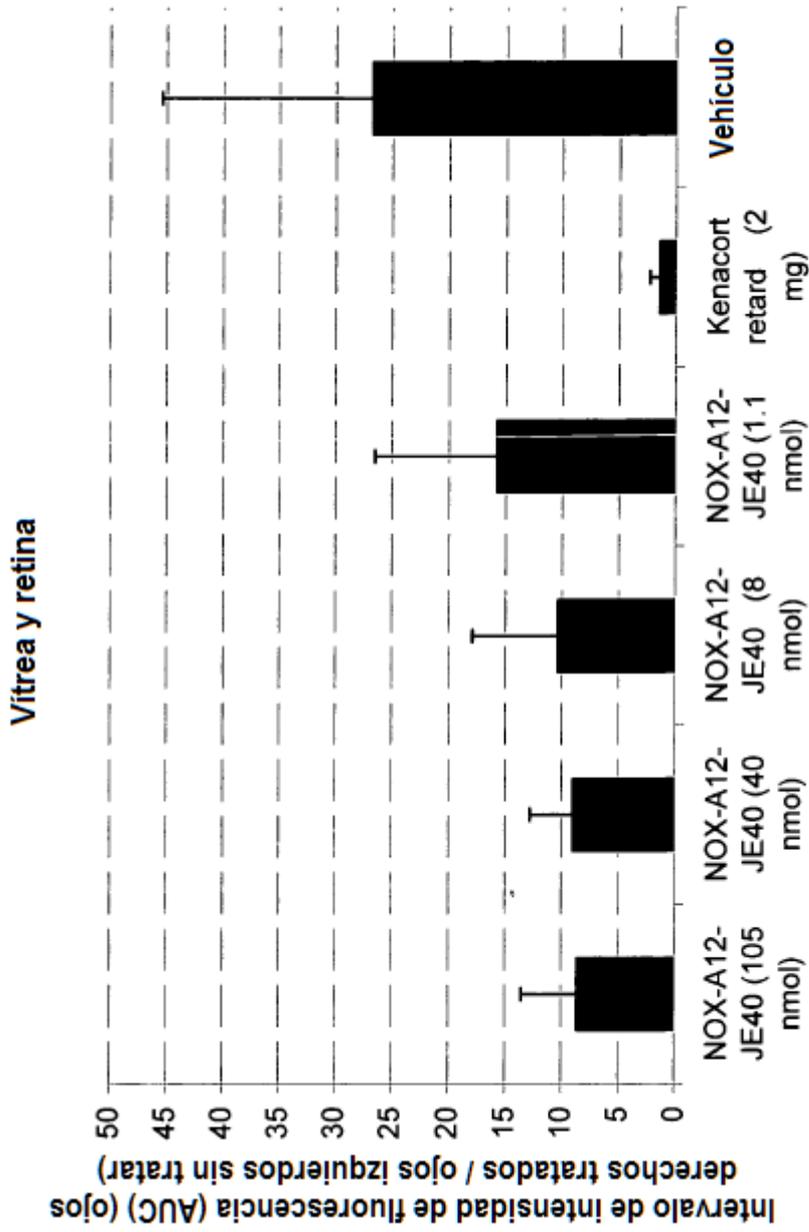


Fig. 38

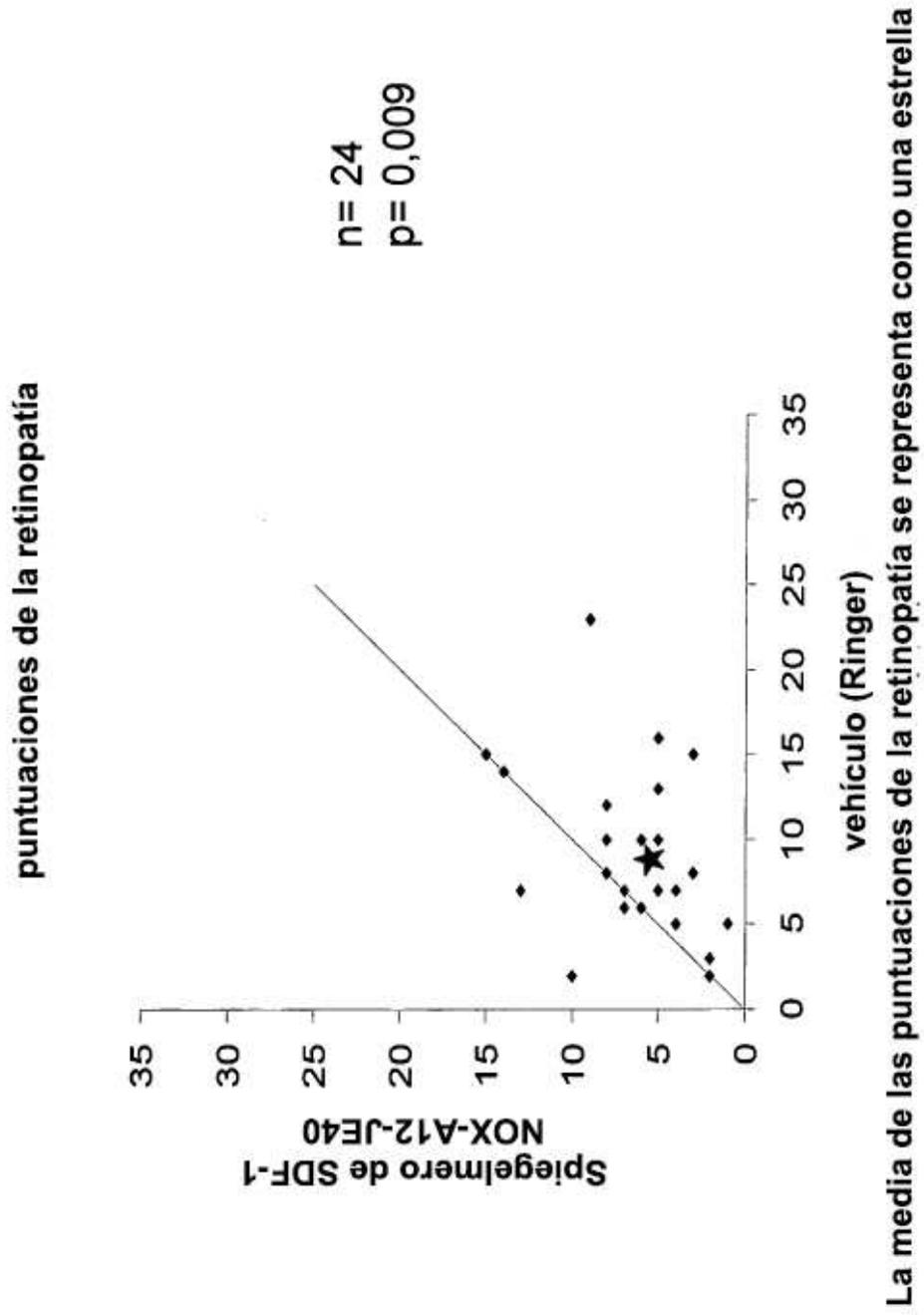


Fig. 39

Estadísticas: Ensayo Wilcoxon-Signed-Rank/valores-p

	Fluoresceína (n=24)	Isolectina (n=15)
Grupos (n)	0,210	0,057
Área absoluta del grupo	0,210	0,501
Área relativa del grupo	0,501	0,365
Penachos (n)	0,008	0,0215
Zona avascular absoluta	0,3531	0,2524
Zona avascular relativa	0,398	0,359
Puntuación de la Retinopatía	0,009	

Fig. 40

Recuento de células sanguíneas blancas después de la administración de NOX-A12

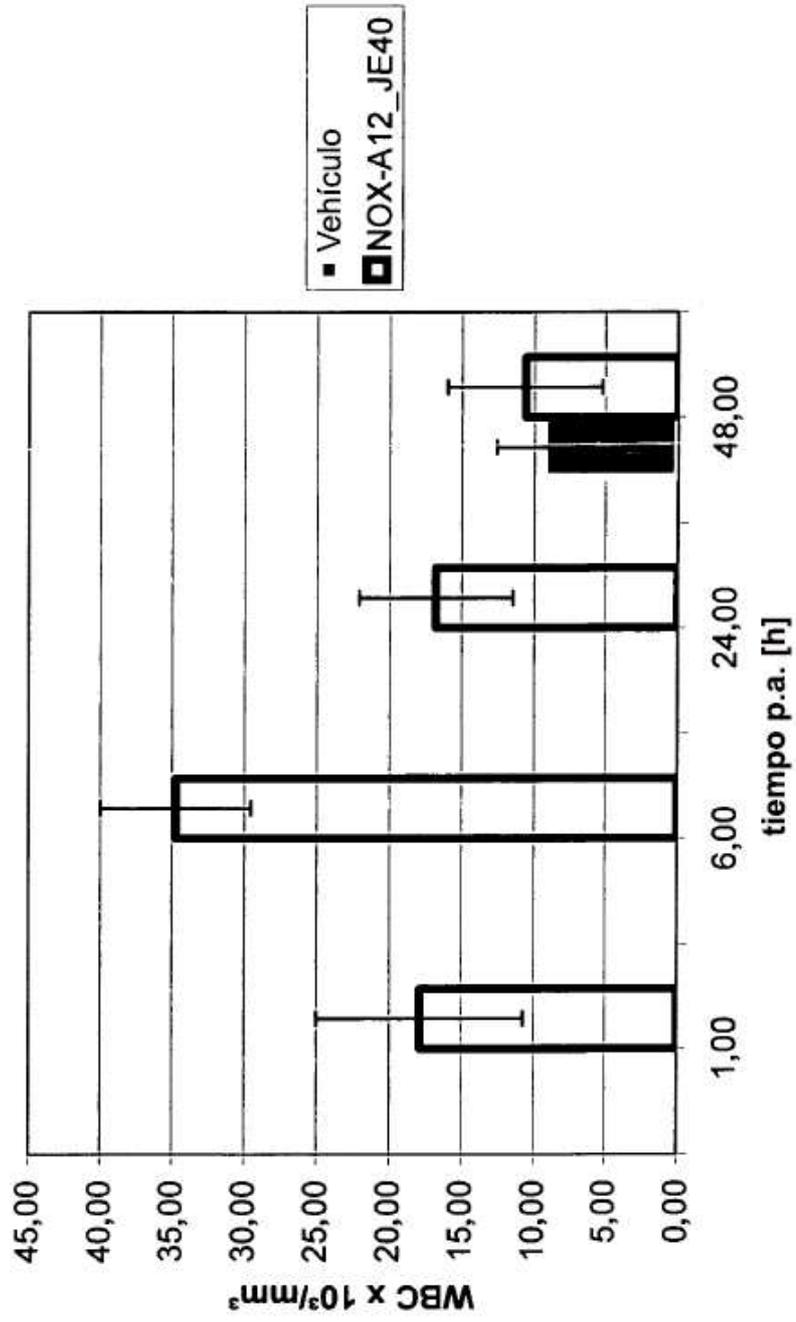


Fig. 41

## Indicaciones para HSTC alogénicas en Europa 1990-2000

	Nº de pacientes			
	Total 1990-2000	%	Total 2000	%
Leucemias	33 509	75,9	4653	72,7
Leucemia mieloide aguda	10 990	24,9	1627	25,4
Leucemia linfocítica aguda	8 871	20,1	1135	17,7
Leucemia mieloide crónica	10 559	23,9	1315	20,5
Síndromes mielodisplásicos	2 680	6,1	454	7,1
Leucemia linfocítica crónica	409	0,9	122	1,9
Trastornos linfoproliferativos	3 930	8,9	820	12,8
Mieloma múltiple	1 470	3,3	295	4,6
Enfermedad de Hodgkin	320	0,7	68	1,1
Linfoma no Hodgkin	2 140	4,8	457	7,1
Tumores sólidos	272	0,6	104	1,6
Neuroblastoma	30	0,1	1	0,0
Glioma	2	0,0	1	0,0
Sarcoma de tejido blando	13	0,0	5	0,1
Tumores germinales	10	0,0	3	0,0
Cáncer de mama	57	0,1	16	0,2
Sarcoma de Ewing	28	0,1	4	0,1
Cáncer de pulmón	1	0,0	0	0,0
Cáncer de ovario	11	0,0	7	0,1
Otros tumores sólidos	120	0,3	67	1,0
Trastornos no malignos	5 695	12,9	700	10,9
Anemia aplásica + Fanconi	2 483	5,6	287	4,5
Talasemia	1 349	3,1	147	2,3
Deficiencias inmunes combinadas	724	1,6	103	1,6
Defectos innatos	1 112	2,5	153	2,4
Enfermedades autoinmunes	27	0,1	10	0,2
Otros	759	1,7	127	2,0
Total	44 165		6404	

Fig. 42

## Indicaciones para HSTC autólogas en Europa 1990-2000

	Nº de pacientes			
	Total 1990-2000	%	Total 2000	%
Leucemias	15 052	17,0	1 764	13,9
Leucemia mieloide aguda	8 129	9,2	1 047	8,2
Leucemia linfocítica aguda	3 765	4,2	302	2,4
Leucemia mieloide crónica	1 967	2,2	148	1,2
Síndromes mielodisplásicos	297	0,3	50	0,4
Leucemia linfocítica crónica	894	1,0	217	1,7
Trastornos linfoproliferativos	48 917	55,1	8 498	66,7
Mieloma múltiple	16 206	18,3	3 388	26,6
Enfermedad de Hodgkin	9 078	10,2	1 226	9,6
Linfoma no Hodgkin	23 633	26,6	3 884	30,5
Tumores sólidos	24 016	27,0	2 286	18,0
Neuroblastoma	1 912	2,2	262	2,1
Glioma	544	0,6	73	0,6
Sarcoma de tejido blando	1 013	1,1	144	1,1
Tumores germinales	2 658	3,0	304	2,4
Cáncer de mama	12 598	14,2	781	6,1
Sarcoma de Ewing	1 401	1,6	244	1,9
Cáncer de pulmón	318	0,4	62	0,5
Cáncer de ovario	628	0,7	100	0,8
Otros tumores sólidos	2 944	3,3	316	2,5
Trastornos no malignos	321	0,4	100	0,8
Anemia aplásica + Fanconi	7	0,0	1	0,0
Talasemia	0	0,0	0	0,0
Deficiencias inmunes combinadas	10	0,0	2	0,0
Defectos innatos	4	0,0	0	0,0
Enfermedades autoinmunes	300	0,3	97	0,8
Otros	492	0,6	84	0,7
Total	88 798	12 732		

Fig. 43